UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ DES SCIENCES D'ALGER
ANNÉE 1942 – N° 2

Contribution à l'étude comparée du Métabolisme des Bacilles Tuberculeux

B. C. G., Humain, Bovin et Aviaire cultivés sur Milieu de Sauton

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université d'Alger

(*Mention Sciences*)

soutenue publiquement le

par

BANCE Ernest, Jean, Henri

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Tunis

Né le 26 Janvier 1882 à S[t] Omer (Pas-de-Calais)

MEMBRES DU JURY

MM. ROSE ..... Président

ROLLET .....

BERNARD ..... Examinateurs

D[r] LAIGRET .....

TUNIS
IMPRIMERIE BASCONE & MUSCAT
41, AVENUE DE LONDRES
1942

UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ DES SCIENCES D'ALGER
ANNÉE 1942 — N° 2

Contribution à l'étude comparée du Métabolisme des Bacilles Tuberculeux

B. C. G., Humain, Bovin et Aviaire cultivés sur Milieu de Sauton

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE

pour le Doctorat de l'Univérsité d'Alger

(*Mention Sciences*)

soutenue publiquement le

par

BANCE Ernest, Jean, Henri

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Tunis

Né le 26 Janvier 1882 à S[t] Omer (Pas-de-Calais)

MEMBRES DU JURY

MM. ROSE ..... Président
ROLLET .....
BERNARD ..... Examinateurs
D[r] LAIGRET .....

TUNIS
IMPRIMERIE BASCONE & MUSCAT
41, AVENUE DE LONDRES
1942

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542710_0043

UNIVERSITÉ D'ALGER

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen	MM. ROYER
Assesseur	VÉRAIN
Secrétaire	SOLÉRA

PROFESSEURS

Mathématiques	MM. BOURION
Mécanique rationnelle et appliquée	DE POSSEL
Astronomie et Astrophysique	MEYER
Physique générale	HENRIOT
Physique industrielle	VÉRAIN
Chimie générale	ROLLET
Chimie appliquée	GUNTZ
Biologie générale et appliquée	ROSE
Botanique générale et appliquée	MAIRE
Géologie et Minéralogie	SAVORNIN J.
Minéralogie et Cristallographie	ROYER
Zoologie	BERNARD
Géologie appliquée à l'Agriculture et à l'Industrie	N.....

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

Botanique agricole	M. KILLIAN

PROFESSEUR SANS CHAIRE

Physique (P.C.B.)	M. MENDOUSSE

MAITRES DE CONFÉRENCES

Mathématiques générales (Chargé de cours)	MM. DUGUÉ
Chimie (P.C.B.)	BERLANDE
Biologie animale	GAUTHIER

MAITRE DE CONFÉRENCE ADJOINT

Chimie appliquée	M. SIROT

HONORARIAT

Doyen et Professeur	MM. ROUYER
Professeur	MULLER
Professeur	FOIX
Professeur	SEURAT

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE

CHARLES DE FIERVILLE

Docteur ès-Lettres

Proviseur honoraire du Lycée Charlemagne à Paris

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

ALBERT BANCE

Proviseur de lycée

A MA MÈRE,

A MA VAILLANTE ÉPOUSE,

modèle d'ardeur au travail et de persévérance,

ma collaboratrice de tous les instants.

MEIS ET AMICIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur M. ROSE

Professeur de Biologie Générale et Appliquée

à la Faculté des Sciences d'Alger

en remerciement de ses précieux et judicieux conseils.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur ROLLET

Professeur de Chimie Générale

à la Faculté des Sciences d'Alger

Monsieur le Professeur BERNARD

Professeur de Zoologie

à la Faculté des Sciences d'Alger

Monsieur le Professeur J. LAIGRET

Professeur de Bactériologie

aux Facultés de Médecine et de Pharmacie d'Alger

PLAN DU TRAVAIL

Introduction.

PREMIÈRE PARTIE

Etude générale et observations

Chapitre I. — *Milieu de culture* — Milieu de Sauton : Formule — préparation — distribution — stérilisation

— Perte de poids des milieux à l'autoclave.

— Perte de poids des milieux vierges à l'étuve à 38° C.

— Ensemencement.

Chapitre II. — *Phénomènes qui accompagnent l'évolution microbienne* : Phénomènes visibles : formation du voile — croissance — arrêt — chute.

Phénomènes non visibles mais décelables par les moyens d'investigation dont nous disposons (balance, etc.)

Milieux vierges — Milieux ensemencés — Tableau I.
Courbes représentatives de l'évolution, leur comparaison, fig. 1 (superposition des courbes ramenées à pH : 7 au départ).
— pH minimum — époque de ce minimum.
Perte de poids des milieux ensemencés à l'étuve à 38° C — Tableau II.
Echanges avec l'atmosphère environnante (échanges gazeux), étude qualitative.
Spectres d'absorption des milieux ensemencés, fig. 2 et fig. 3.

Chapitre III. — *Masses microbiennes* — Masses de microbes secs produits en fonction du temps. Tableau III.

— Courbes superposées des masses microbiennes dans le temps. Fig. 4.

— Temps d'évolution microbienne.

— Essai de diagnose des divers bacilles tuberculeux. Tableau IV.

DEUXIÈME PARTIE

Essais quantitatifs

CHAPITRE I. — *Essai d'une étude quantitative des échanges gazeux :*

— Appareil pour cette étude. Fig. 5. — Description — fonctionnement.
— Prélèvement d'air dans l'appareil. Fig. 6.
— Analyse de l'air : appareil de Hahn — appareil de Vignon. Fig. 7.
— Solutions employées — Opération sur 100 cc. d'air.
— Résultats obtenus.
— Interprétation. Tableau V (échanges gazeux pour 300 cc. de Sauton).

CHAPITRE II. — *Etude chimique quantitative des éléments hydrocarbonés :*
(Consommation de l'acide citrique et du glycérol)

1° Acide citrique — mode de dosage.
2° Glycérol — dosage :
a) procédé Laborde;
b) procédé Nicloux.
Tableau VI (concentrations en glycérol et consommations correspondantes).
Remarques. Fig. 8 (courbes de consommation comparées).
c) Essai d'interprétation.
d) Coefficient d'utilisation. Tableau VII (C. bacillaire formé — C. du glycérol disparu — Coefficients correspondants).
e) Remarques. Fig. 9.

CHAPITRE III. — *Etude chimique quantitative des éléments azotés :*

A. — Ammoniac.
B. — Asparagine. 1° Procédés de dosage :
a) en solution aqueuse;
b) en milieu non étuvé;
c) en milieu étuvé, non ensemencé;
d) en milieu étuvé, ensemencé;
Trois opérations nécessaires : Kjeldahl — Maquenne A — Maquenne B.
e) précision des opérations effectuées.
2° Résultats obtenus sur les cultures microbiennes :
Tableau VIII (quantités d'acide sulfurique décinormal obtenues sur 20 cc. de milieu. — Remarques.
— Traduction en poids d'azote des résultats précédents :
Tableau IX (chiffres d'azote en fonction du temps, après correction).
Tableau X (répartition de l'azote entre : ammoniacal, amidé et aminé).
Tableau XI (taux correspondants d'ammoniac, asparagine et acide aspartique). — Remarques sur ce tableau.
3° Teneur des microbes secs en azote, en fonction du temps.
Tableau XII.

4° Bilan de l'azote dans les milieux ensemencés, en fonction du temps
Tableau XIII. — Fig. 10.

Chapitre IV. — *Etude chimique quantitative des éléments minéraux*
1° Variations de la concentration en sulfate de magnésie.
Tableau XIV (concentrations en sulfate et consommations correspondantes). Fig. 11.
2° Variations de la concentration en phosphate bipotassique.
Tableau XV (concentrations en phosphate et consommations correspondantes). Fig. 12.
Remarques.

TROISIÈME PARTIE

Etude des changements survenus dans les milieux au cours de l'évolution

Chapitre I. — *Essai de détermination des corps qui ont pris naissance dans les milieux :*
1° Formation d'acides :
Essai de précipitation par le mercure;
Essai de précipitation par le calcium;
Essai Mestrezat;
Essai de cristallisation des sels de calcium;
Gamme de teinte des sels de cuivre.
2° Formation de protéines.
3° Formation d'une substance réductrice; essai d'étude qualitative et quantitative de cette substance.
4° Formation d'une substance d'odeur aromatique.

Chapitre II. — *Essai d'interprétation chimique de l'ensemble des résultats :*
a) Eléments fournis par le milieu de Sauton :
Tableau XVI (quantités apportées par un litre de milieu de Sauton).
b) Eléments apparus dans la masse microbienne — quantités supposées.
c) Eléments disparus au cours de l'évolution :
Tableau XVII (quantités de ces éléments).
d) Discussion. — Constituants du milieu de Sauton : examen rapide des transformations qu'ils ont pu subir sous l'influence de la vie microbienne.

Conclusion générale.

Contribution à l'étude comparée du Métabolisme des Bacilles Tuberculeux B. C. G., Humain, Bovin et Aviaire cultivés sur Milieu de Sauton

INTRODUCTION

Notre collaborateur et ami, le Professeur J. Debiesse, a présenté, sous forme de thèse (1), une étude physico-chimique du métabolisme du bacille tuberculeux B.C.G., cultivé sur milieu de Sauton. Nous avons pensé, comme lui-même l'a indiqué dans ses conclusions, qu'il serait intéressant d'étendre cette étude aux autres bacilles tuberculeux, nous voulons dire aux bacilles tuberculeux : humain, bovin et aviaire, agents de la tuberculose chez les animaux à sang chaud ou à température constante. Nous avons laissé de côté les bacilles pisciaires qui paraissent être les propagateurs de la tuberculose chez les animaux à sang froid, ou à température variable, et autres acido-résistants semblables

Telle est, en quelques mots, la matière du présent travail.

Les méthodes d'investigation que nous avons appliquées à l'étude des trois bacilles : humain, bovin et aviaire, sont celles qui nous avaient servi, à J. Debiesse et à moi, lors de l'étude du bacille B.C.G. En ce qui concerne la partie chimique du travail, ces méthodes avaient été choisies et mises au point dans notre laboratoire de l'Institut Pasteur.

En somme nous avons continué une collaboration étroite commencée avec l'étude du B.C.G. Le sujet étant très vaste, nous avons décidé, d'un commun accord, d'en faire le partage. J. Debiesse le développait, surtout dans son aspect physique, nous laissant le bénéfice de l'étude chimique comparée.

Dans le courant de notre exposé nous reprenons certaines descriptions de procédés ou d'appareils, non pour en revendiquer

l'originalité, mais pour y apporter les détails précis auxquels notre collaborateur avait délibérément renoncé.

Nous reconnaissons à J. Debiesse la paternité de tous les résultats qu'il a publiés, et si les chiffres donnés par lui, pour le B.C.G., se retrouvent dans nos tableaux, c'est que nous sommes obligé de les y faire figurer, pour rendre plus facile l'étude comparative que nous avons entreprise.

Nous avons adopté, pour la désignation des bacilles à l'étude, des abréviations très simples comportant la première ou les deux premières lettres de leur nom : B. = bovin, H. = humain, Av. = aviaire.

Dans toutes nos expériences, nous sommes parti d'un même volume, soit 300 cc., du milieu de Sauton, préparé dans des conditions toujours les mêmes, et présentant un pH colorimétrique égal à 7,2 ou très approchant de 7,2.

Les ballons étaient tous pesés avant le passage à l'autoclave, et leur poids inscrit sur le chapeau de papier.

Pour l'étude de chaque bacille, nous avons ensemencé deux séries de ballons, généralement une vingtaine, tous numérotés; à raison de deux chaque semaine, ce nombre nous permettait une étude assez prolongée, et nous assurait le matériel nécessaire à certains dosages complémentaires ou à certaines vérifications. Les ballons, aussitôt ensemencés, étaient tous portés, sans secousse, à l'étuve à 38° C. Chaque semaine, deux ballons étaient sortis de l'étuve pour examen. Le poids de chacun était noté avec soin (P).

Le contenu, microbes et milieu, était, après mélange, versé sur un double filtre (filtres équilibrés pliés en quatre et mis l'un dans l'autre sur un entonnoir). Les microbes restés dans le ballon étaient repris par une partie du filtrat et entraînés sur le double filtre.

Le double filtre était bien égoutté, les deux filtres séparés et abandonnés pendant dix minutes sur plusieurs épaisseurs de papier à filtrer; l'excès de liquide qui les baignait encore était ainsi absorbé. Puis les deux filtres étaient remis sur la balance. La différence de poids donnait le poids approximatif des microbes à l'état humide (π).

Les filtres étaient alors placés dans une boîte de Petri sans couvercle et portés à l'étuve à 80°, où ils séjournaient jusqu'à poids constant. La température de 80 ° nous a semblé la plus favorable, pour ne pas altérer la substance des microbes; ceux-ci gardaient ainsi leur aspect et leur couleur propres. La pesée des filtres séchés

devait permettre, au bout de vingt-quatre heures environ, de connaître le poids des microbes secs contenus dans le ballon.

Le ballon, vidé de son contenu, était pesé avec son bouchon de coton et son chapeau de papier (p).

Nous avions ainsi un certain nombre d'éléments qui nous permettaient de connaître :

le poids de microbes humides du ballon (π);

le poids du milieu seul ($P - p - \pi$);

le pH colorimétrique du milieu;

le poids de microbes secs du ballon, π' (300 cc. au départ);

le poids de microbes secs par litre de milieu $\left(\pi' \times \frac{10}{3}\right)$.

Restaient alors à notre disposition, pour l'analyse, presque tout le milieu filtré d'une part, la totalité des microbes secs d'autre part.

1° Sur le milieu filtré nous prélevions une petite quantité destinée à l'examen spectrographique.

Sur le reste nous dosions régulièrement :

— le glycérol demeuré intact au sein du liquide;

— l'ion sulfate SO^4;

— l'ion phosphate PO^4;

— l'azote de l'ammoniac et l'azote amidé de l'asparagine restante;

— l'azote amidé de l'asparagine seul;

— l'azote total du milieu : azote ammoniacal, azote amidé, azote aminé, plus l'azote protéique passé par lyse dans le liquide.

A cet ensemble d'essais quantitatifs nous ajoutions :

— le dosage approximatif de l'acide citrique;

— et le dosage colorimétrique rapide du fer.

2° Sur la masse de microbes séchés nous dosions l'azote total des microbes secs.

Tous les résultats obtenus étaient calculés pour le ballon soumis à l'analyse, c'est-à-dire pour le volume initial de 300 cc. de milieu de Sauton, et rapportés ensuite à un litre de ce milieu.

Nous n'avions plus qu'à prendre la moyenne des chiffres trouvés pour les deux ballons de chaque semaine; c'est cette moyenne que nous avons inscrite dans nos tableaux.

Muni de tous ces résultats, tous étions en mesure d'établir, semaine par semaine, le bilan des pertes du milieu de Sauton, parallèlement au bilan des gains de la masse microbienne.

Pour les éléments carbonés (le glycérol en particulier), l'élément azoté (l'asparagine), et les ions sulfate et phosphate, nous avons pu représenter par des graphiques leurs variations pendant toute la durée de l'évolution du voile microbien. De même nous avons pu rendre plus saisissables le développement progressif de la masse microbienne, ses gains en substances puisées dans le milieu (en azote particulièrement), l'acidification progressive du milieu (variation du pH). Nous avons pu également, grâce à un dispositif déjà décrit par J. Debiesse, connaître l'importance des échanges gazeux (absorption d'oxygène, rejet d'acide carbonique).

Enfin nous avons pu constater, au nombre des déchets élaborés et abandonnés par les microbes dans le milieu, la présence constante et de valeur croissante avec l'âge de la culture, d'une petite quantité de substance réductrice, qui a fait l'objet d'une étude particulière.

Signalons encore la présence d'un principe odorant, caractéristique des cultures de B. K. sur milieu de Sauton, dont nous reparlerons plus tard.

De tout l'ensemble de nos essais nous avons tiré des conclusions ou tout au moins des déductions, dont quelques-unes peuvent sembler en désaccord avec celles de notre collaborateur; cela provient uniquement du fait que nous avons l'avantage de nous appuyer sur un nombre d'expériences beaucoup plus considérable, ce qui nous a amené à modifier certaines déductions issues des premiers essais.

Enfin nous sommes à même de faire une étude comparative du développement des divers bacilles dits tuberculeux. Si ce développement, observé sur un milieu toujours le même, est soumis à un certain nombre de règles générales, il existe pourtant, d'un bacille à l'autre, des différences assez marquées dans leur processus de vie, leur affinité pour tel constituant du Sauton, la rapidité de formation du voile et de sa croissance, la teneur des germes en tel élément, comme l'azote, etc...

Le présent travail a été fait à l'Institut Pasteur pour tout ce qui concerne les parties bactériologique et chimique (cette dernière au laboratoire de Chimie biologique, dont nous avons la direction depuis 1919). La partie physique a été traitée au laboratoire de Physique du Service botanique et agronomique de la Régence de Tunis où M. Montlaur, Chef de ce laboratoire, nous a apporté le concours de sa science et de son expérience.

PREMIÈRE PARTIE

Etude Générale et Observations

CHAPITRE PREMIER

Milieu de culture : Milieu de Sauton

Le milieu de culture adopté par nous est celui qui a déjà été utilisé au cours de l'étude du B.C.G. C'est le milieu de Sauton (2).

Ce milieu a le grand avantage d'avoir une composition parfaitement définie, simple et facile à réaliser, puisqu'il est entièrement artificiel.

Formule. — Sa formule est la suivante :

Asparagine	4	grammes
Acide citrique	2	—
Glycérol	60	—
Phosphate bipotassique	0,5	—
Sulfate de magnésium	0,5	—
Citrate de fer ammoniacal	0,05	—
Eau distillée	940	—
Ammoniaque à 20 p. 100	Q. S.	

Le milieu de Sauton doit présenter, au moment de l'ensemencement, un pH égal à 7,2, pour obtenir un développement normal des bacilles tuberculeux.

Préparation. — Pour le préparer, on met dans un ballon assez grand tous les produits solides : asparagine, acide citrique, phosphate de potassium, sulfate de magnésium, citrate de fer ammoniacal) avec leurs poids respectifs; on y ajoute les 940 grammes d'eau distillée, et l'on chauffe doucement jusqu'à dissolution complète, en évitant un excès de température qui causerait une perte de volume. On ajoute les 60 grammes de glycérine et on laisse refroidir.

L'addition d'ammoniaque n'est destinée qu'à ramener le pH de l'ensemble au pH favorable de 7,2. La quantité d'ammoniaque à ajouter est forcément variable; elle est fonction du pH de l'ensemble des produits ajoutés à l'eau, mais surtout du pH de l'eau distillée employée.

Généralement il est nécessaire de verser approximativement trois centicubes d'ammoniaque pure à 22° B. (20 p. 100 d'ammoniac) dans un litre de milieu refroidi, pour obtenir un pH égal à 7,3.

On ajoute donc une première fois 2,8 cc. ou 2,9 cc.; ensuite on procède par dixième de centi-cube, pour ne pas en verser trop.

Après chaque addition d'ammoniaque, on prélève 5 cc. du milieu sur lesquels on mesure le pH. On opère ainsi par tâtonnements jusqu'à ce qu'on ait obtenu un pH égal à 7,3.

Il est prudent, en effet, de ne pas établir le pH du milieu au-dessous du chiffre 7,3 si l'on veut obtenir 7,2 après stérilisation à l'autoclave. Au cours de cette opération il y a forcément une légère perte d'ammoniac, perte suffisante pour provoquer une chute du pH de 0,1, parfois davantage.

Distribution. — Le milieu ainsi préparé est distribué dans des ballons.

Les ballons employés par nous étaient des ballons à fond plat, en verre Pyrex, d'une contenance de 750 centi-cubes.

Dans chaque ballon nous mettions 300 centi-cubes du milieu. De la sorte la surface libre du milieu, arrivant à peine au-dessous du plus grand diamètre du ballon, était au maximum, et nous ménagions au-dessus du liquide un volume d'air, autrement dit une atmosphère assez considérable pour les échanges gazeux: cette atmosphère pouvait se renouveler au travers du bouchon de coton placé au sommet du col.

Les ballons garnis de Sauton étaient tous bouchés soigneusement avec du coton cardé, modérément tassé, pour faciliter le passage des gaz, et le tout recouvert d'un chapeau de papier sulfurisé, maintenu au col par une ficelle à nœud glissant.

Stérilisation. — A ce moment-là tous les ballons bouchés étaient pesés exactement, puis portés à l'autoclave, où ils étaient soumis à une chauffe de 120° pendant 15 minutes. Ce temps écoulé, il ne fallait pas laisser échapper la vapeur, pour ne pas provoquer une détente et, avec elle, un départ massif d'eau par ébullition. Le

refroidissement était obtenu lentement, après simple extinction de la rampe de gaz.

L'autoclave, complètement refroidie, était ouverte, les ballons retirés avec soin et pesés à nouveau, puis mis de côté pour leur utilisation prochaine; chacun d'eux était muni d'une étiquette portant un numéro d'ordre et son poids.

Perte de poids des ballons à l'autoclave. — L'opération de stérilisation sous pression à l'autoclave n'est pas sans provoquer le départ d'une certaine quantité d'eau à l'état de vapeur. Ce départ a pu être contrôlé par la balance, qui accusait, sur les ballons sortant de l'autoclave, des diminutions de poids variant de 16 à 26 grammes, ces quantités extrêmes étant des exceptions, les autres oscillant généralement autour du chiffre moyen de 21 grammes, chiffre moyen qui résulte de nos observations sur un minimum de 70 ballons ensemencés de bacilles différents.

Si nous admettons un départ de 21 grammes par ballon (300 cc. de milieu), cela nous fait 70 grammes par litre de Sauton, soit 7 p. 100 du liquide initial, ce qui est loin d'être négligeable.

Nous nous sommes demandé pourquoi les pertes de poids étaient si différentes d'un ballon à l'autre; en effet l'écart pouvait atteindre 10 grammes entre le maximum (26) et le minimum (16), soit 38,5 pour 100. Nos ballons étaient pourtant des ballons Pyrex, tous de même contenance, de mêmes dimensions, nous permettant d'avoir des surfaces d'évaporation sensiblement égales du milieu de Sauton; les cols de ces ballons étaient pratiquement de même calibre. Etant donné qu'ils contenaient les mêmes quantités d'un même liquide, et subissaient ensemble, dans des conditions rigoureusement identiques, la même opération de stérilisation, nous pouvions croire à des pertes de poids sensiblement égales, tout au plus différentes de 2 ou 3 grammes.

Nous avons dû nous rendre à l'évidence du fait constaté et en avons décelé la cause, fort simple d'ailleurs, mais difficilement évitable, dans la différence de tassement du bouchon de coton qui obstrue le col de chaque ballon à stériliser.

La preuve de ce que nous avançons réside dans ce fait que ce sont les mêmes ballons qui, tout au long de nos opérations successives, ont présenté des écarts en moins dans l'évolution de leur perte de poids, soit qu'ils aient continué à freiner les échanges gazeux, soit qu'ils aient conservé le retard du début.

Perte de poids des ballons vierges à l'étuve à 38° C. — Nous venons de voir que les ballons de Sauton subissent une perte de poids moyenne de 7 pour 100 lors de leur passage à l'autoclave.

Si ces mêmes ballons sont placés, sans être ensemencés, à l'étuve à 38° C., ils y subissent une perte de poids constante, évaluée par notre collaborateur à 7 grammes par semaine et par litre. Il est probable qu'à un moment donné, le milieu se concentrant de plus en plus, l'évaporation se ralentit considérablement et qu'au bout d'un temps X, dont nous n'avons pas idée, elle devient pratiquement nulle.

Il ne faudrait pas croire cependant que les choses se passent aussi simplement en ce qui concerne les ballons de Sauton vierge.

En plus du départ d'eau à l'état de vapeur, il se produit aussi un départ d'azote à l'état ammoniacal, départ peu important par son poids, mais pouvant atteindre 100 milligrammes par litre de milieu.

Cette perte d'azote ammoniacal, que nous n'avions pas prévue, nous a été révélée dans les circonstances suivantes :

Pour donner plus de valeur à nos expériences, nous avions eu l'idée de mettre à l'étuve, en même temps que nos séries de ballons ensemencés, des ballons de milieu vierge, dits *ballons témoins*.

Les dosages, effectués parallèlement sur ballons ensemencés et sur ballons témoins, devaient nous donner des résultat plus certains.

Or, en ce qui concerne les dosages d'azote, nous trouvions au total plus d'azote dans les ballons ensemencés que dans les ballons témoins correspondants. La différence allait en s'accentuant avec l'âge des cultures.

Ou bien il fallait admettre que les cultures absorbaient de l'azote quelque part, dans l'atmosphère par exemple;

Ou bien les différences constatées provenaient d'une perte en azote des ballons témoins eux-mêmes.

Nous avons donc été amené à doser l'azote total dans les ballons de Sauton vierge maintenus à l'étuve à 38° C. et avons pu constater que ces ballons perdaient graduellement de l'azote sous la forme ammoniacale.

Voici comment nous pouvons expliquer le fait :

Au cours de la stérilisation à l'autoclave, l'azote total diminue déjà. Une partie de l'ammoniac ajouté pour ajuster le milieu s'échappe; le pH diminue et passe de 7,3 à 7,2, parfois à 7,1. A la sortie de l'autoclave, l'asparagine est déjà faiblement hydrolysée

en aspartate d'ammonium. Si le Sauton est mis à l'étuve à 38° C., l'hydrolyse continue; il y a encore perte d'azote ammoniacal; le pH baisse.

Un ballon témoin, resté huit semaines à l'étuve à 38° C., a vu son pH tomber de 7,2 à 6,9. Les 2/5 de son asparagine ont été hydrolysés, l'azote total n'était plus que de 1,150 grammes au litre au lieu de 1,250 gr. au départ.

Ensemencement. — Les souches microbiennes n'étaient pas employées directement, mais après passage sur pomme de terre. C'est le voile formé par ces dernières cultures sur le liquide de la partie inférieure des tubes qui était utilisé.

Après avoir sorti du tube le fragment de pomme de terre, une portion du voile était chargée sur une spatule de platine et transportée aseptiquement dans un ballon débouché extemporanément. La spatule, plongée dans le milieu de culture, abandonnait le fragment de voile qui commençait à s'étaler.

Le ballon rebouché et recoiffé était alors porté, avec d'infinies précautions, à l'étuve à 38° C., en une place stable, à l'abri de toute trépidation. L'opération ayant été bien conduite, le fragment de voile flottait à la surface du liquide, loin des parois du ballon.

CHAPITRE DEUXIÈME

Phénomènes qui accompagnent l'évolution microbienne

Le développement du voile microbien, depuis son ensemencement jusqu'à son complet épanouissement, est accompagné d'un certain nombre de phénomènes.

Les uns, visibles ou *apparents*, intéressent le voile en lui-même, sa formation, sa croissance, son arrêt et sa chute;

Les autres, non visibles ou *inapparents*, mais décelables par les moyens d'investigation dont nous disposons (balance, appareils de mesure) intéressent le liquide nourricier milieu de Sauton), ses modifications sous l'influence de la vie microbienne : acidification, propriétés optiques, perte de poids, échanges avec l'atmosphère environnante; ils intéressent aussi cette atmosphère dont la composition subit de profondes modifications.

Phénomènes apparents. — Lors de l'ensemencement, la portion de voile, introduite par la spatule de platine, s'étale à la surface du liquide, formant une pellicule très mince et de peu d'étendue.

Après quelques jours d'étuve, cette pellicule commence à grandir, puis elle recouvre peu à peu toute la surface libre du milieu (formation du voile);

Entre temps apparaissent en de nombreux points des épaississements, noyaux de développement plus intense, qui envahissent bientôt toute la surface du voile. Ce dernier grimpe le long des parois du ballon sur une hauteur de un centimètre environ. Au fur et à mesure de son épaississement, le voile se plisse, augmentant sa surface de contact avec l'air environnant, ce qui favorise les échanges, et par suite la multiplication des germes (croissance du voile);

Au bout d'un temps variable, quand l'épaisseur du voile atteint un centimètre environ, aucun changement n'apparaît plus (arrêt de croissance).

Le voile flotte longtemps encore au-dessus du liquide, mais il devient de plus en plus perméable à l'eau du milieu et, soit de lui-

même, soit sous l'action d'une trépidation ou d'un choc, il se détache des parois et tombe au fond (chute du voile).

Il serait très difficile, pour ne pas dire impossible, de reconnaître à ces phénomènes successifs une durée déterminée.

La formation du voile, qui demande 8 à 10 jours pour le B.C.G., et le bacille Bovin, exige au moins 15 à 20 jours pour les bacilles Humain et Aviaire, dans les conditions de culture où nous nous sommes placé, bien entendu.

Par contre, la durée totale de l'évolution du voile paraît être fixe, quoique n'étant pas la même pour les quatre variétés de bacilles tuberculeux. C'est une déduction que nous avons été heureux de tirer de l'ensemble de nos expériences. Nous en reparlerons plus loin.

Phénomènes inapparents. — Ce sont ceux qui intéressent le milieu nutritif et l'atmosphère environnante.

Evolution du pH des milieux placés a l'étuve a 38° C.

Toutes nos mesures de pH ont été faites au moyen du comparateur de Hellige et Cie (Fribourg en Brisgau).

Nous avons pris très régulièrement le pH de tous nos milieux, au fur et à mesure que nous les soumettions à l'analyse.

Ici nous rappellerons la distinction déjà faite entre les milieux vierges et les milieux ensemencés :

Les milieux vierges, qui ont déjà perdu du poids et un peu de gaz ammoniac lors de la stérilisation à l'autoclave, continuent, très lentement d'ailleurs, à subir les mêmes pertes. Leur pH ne peut que s'en ressentir et descendre légèrement. En six semaines il passe en effet de 7,1 à 6,9. La baisse, en tout ce temps, n'est que de 0,2.

Quant aux milieux ensemencés, la question est plus complexe. La vie microbienne a une action considérable sur le pH.

Au début, alors que le voile n'a pas eu le temps de se développer, le milieu devient franchement alcalin. L'hydrolyse de l'asparagine se faisant très activement, produit un sel ammoniacal (aspartate d'ammonium) qui contribue à élever le pH. Puis la masse microbienne prend de l'importance, l'azote ammoniacal est rapidement assimilé; son renouvellement ne pouvant être assuré, faute d'asparagine, le pH commence à baisser.

Tant que dure l'évolution du voile, le pH continue son mouvement de descente.

Telle est la physionomie du phénomène, en général. Nous verrons plus loin que le bacille Aviaire s'écarte de cette règle.

Nous avons réuni dans le tableau I les valeurs du pH relevées au cours de nos essais sur les divers bacilles tuberculeux.

Tableau I. — **Evolution du pH des milieux sous l'influence de la vie microbienne.**

Temps en jours	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	130
Sauton vierge	7,1	7,1	7,1	7,1	7	7	6,9	6,9	6,9			
Sauton cult. en B. C. G.	7,2	7,4	7,5	7,4	7	6,4	6					
— — H.	7,1	7,3	7,5	7,3	7,5	5,8	5,3	5	4,8	4,7	4,4	4,4
— — B.	6,9	7,3	7,5	6,7	5,5	5,1	4,9	4,9	5,3	5,5		
— — Av_{Ay}	7	6,8	6,9	6,5	5,8	6,5	5,2	5,2	4,3	4,2		
— — Av_{gg}	7,2		7,1	6,7	5,3							

A part quelques chiffres qui ne cadrent pas parfaitement, la marche générale est régulière pour tous les bacilles. Les chiffres dissidents correspondent à des ballons retardés dans leur évolution.

La lecture du tableau ci-dessus nous suggère un certain nombre de remarques qui nous semblent intéressantes et que nous essayons de rendre plus saisissantes par une superposition des courbes représentatives de l'évolution du pH pour chaque bacille. Fig. I.

I. — *pH minimum.* — Le B.C.G. est le bacille pour lequel le pH descend le moins; ce dernier ne paraît pas franchir le chiffre 6.

Dans le cas du bacille B., le pH franchirait à peine le chiffre 5 (4,9). En cela le bacille B. se rapprocherait encore du B.C.G. Ce dernier acidifierait moins le milieu en raison de son atténuation.

Les bacilles H. et Av. voient le pH de leur milieu descendre nettement vers le chiffre 4.

II. — *Exception du bacille Av.* — Le bacille Aviaire présente une particularité : le pH de ses cultures devient directement acide, sans passer par une phase d'alcalinisation. Nous en aurons l'explication plus tard, lors de l'étude de la nutrition azotée.

Nous avons tenu à ne pas nous contenter des séries ensemencées avec le bacille Av Ay. Nous avons ensemencé deux séries nouvelles avec une souche différente étiquetée Av gg. Ces séries nous ont donné exactement la même marche descendante. Nous n'avons

d'ailleurs pas poursuivi l'expérience plus loin que la quatrième semaine.

III. — Le pH des cultures atteint son minimum à la fin de la période de développement du voile, c'est-à-dire après six semaines pour les bacilles B.C.G. et B., et après neuf semaines pour les bacilles H. et Av. Nous préciserons ce fait au chapitre des masses microbiennes.

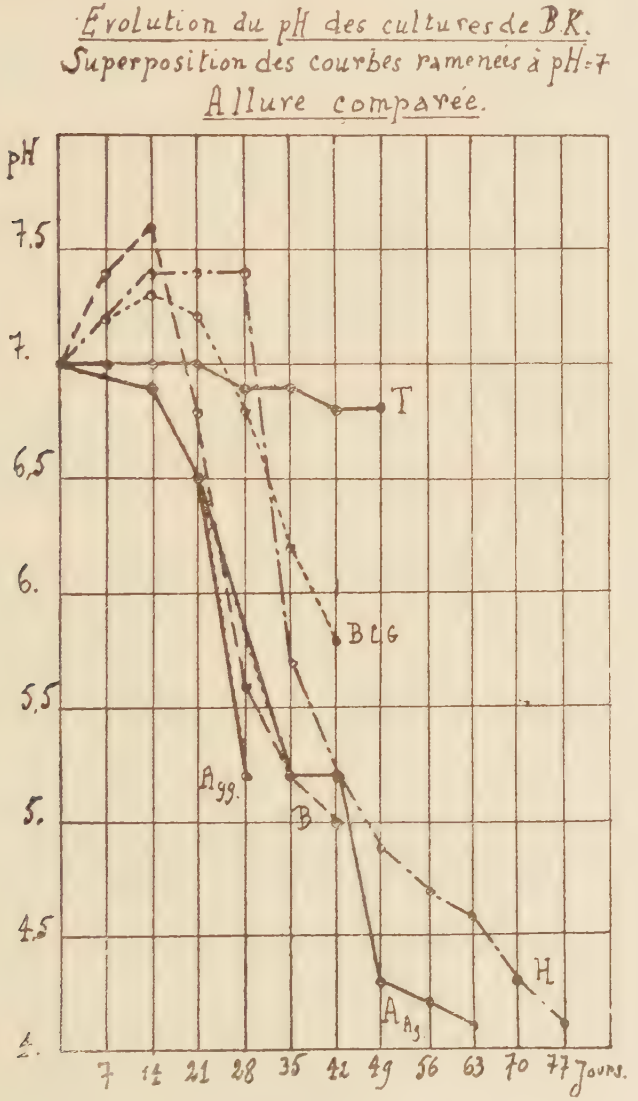


Fig. 1

Perte de poids des milieux ensemencés, a l'étuve a 38° C.

Les milieux ensemencés, séjournant à l'étuve à 38° C., présentent les mêmes phénomènes que les milieux vierges dans les mêmes conditions.

Nous avons pu reconnaître, d'une façon constante, un départ de vapeur d'eau.

Mais ici l'hydrolyse de l'asparagine est accélérée par la vie microbienne. Dès les premiers jours elle est considérable, le pH s'élève et devient nettement basique. A ce moment, il y a une légère perte d'azote, perte moins importante que dans les ballons témoins, parce que les microbes sont là, prêts à utiliser l'ammoniac formé, pour leur développement. Le pH devient acide. L'hydrolyse de l'asparagine se poursuit jusqu'à devenir quasi-totale, lors du complet développement du voile.

Dans le cas spécial du bacille Av., l'hydrolyse est plus lente, bien qu'aussi complète; l'ammoniac est utilisé au fur et à mesure de sa formation. Nous aurons à revenir sur ce fait quand nous traiterons de l'alimentation azotée.

En plus du départ d'eau et d'ammoniac, dont nous venons de parler, les milieux ensemencés perdent, sous l'influence de la vie microbienne, un certain poids d'acide carbonique, accompagné d'une petite quantité d'hydrogène sulfuré.

Nous avons jugé indispensable de reconsidérer la question de diminution de la masse totale des ballons ensemencés, à l'étuve à 38° C., en portant la durée de l'observation à 9 semaines au lieu de 6, cette observation étant faite sur quatre double-séries de ballons, une pour le bacille H, deux pour le bacille B. (B_1 et B_2), et une pour le bacille Av.

Tableau II. — **Diminution de la masse totale des ballons ensemencés, à l'étuve à 38° C.**

Temps en jours	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Culture de H., en gr	—	—	20	16,6	36,6	40	43,3	60	79	86,6
Culture de B_1	—	10	23,3	30	46,6	46,6	66,6	63,3	80	86,6
Culture de B_2		10	20	33,3	40	50	73,3	80	83,3	100
Culture de Av.	—	—	26,6	33,3	50	50	66,6	70	90	86,6

Les chiffres que nous avons mis dans ce tableau n'ont qu'une valeur relative. Nous n'y trouvons pas une progression régulière, pour la raison que nous exposions plus haut (gêne dans les échanges gazeux par des bouchons de coton trop tassés). C'est le cas du bacille H. à 21 jours, du bacille B_1 à 49 jours, du bacille Av. à 63 jours, pour ne citer que les cas les plus typiques.

Ce tableau nous montre qu'il serait superflu de vouloir assigner une règle fixe à la marche d'un phénomène soumis à des influences si diverses. Nous ne fixerons donc pas de taux de perte de poids à la semaine, nous nous contenterons de dire que les ballons perdent du poids d'une façon constante, au moins pendant 9 semaines.

Cependant, poursuivant l'expérience beaucoup plus loin encore, nous avons repris, le 8 mai 1939, un ballon ensemencé en H. le 15 décembre précédent et demeuré à l'étuve à 38° C. depuis cette époque. La culture avait un âge de 143 jours, soit 20 semaines et 3 jours. La perte de poids du ballon à l'étuve était de 117 grammes au litre (au bout de 9 semaines, elle était déjà de 87 grammes).

Un autre ballon de la même série H., du 15 décembre 1938, sorti de l'étuve le 15 janvier 1940, c'est-à-dire 13 mois après, accusait une perte de poids de 90 grammes, soit 300 grammes au litre de Sauton.

Il ne peut donc être question d'arrêt de la perte de poids des ballons ensemencés, à la quatrième semaine, comme l'a écrit J. Debiesse.

Mais à partir du moment où le voile cesse de se développer, faute de place ou faute de nourriture, les pertes ne représentent plus qu'une simple évaporation d'eau. Le pH remonte légèrement. A l'analyse du milieu, les taux des différents corps dissous reprennent une marche plutôt ascendante, autant par suite de la concentration que par suite de la lyse que subissent les microbes morts (cas des ions sulfate et phosphate et de la matière azotée).

Echanges avec l'atmosphère environnante : Echanges gazeux. Preuves de ces échanges.

Nous avons vu précédemment que les ballons placés à l'étuve à 38° C. sont soumis à des variations de poids dûes à des échanges entre le milieu de Sauton et l'atmosphère.

Les ballons de Sauton vierge perdent de la vapeur d'eau et de l'ammoniac; les ballons ensemencés perdent également de la vapeur d'eau et un peu d'azote, à l'état ammoniacal aussi sans doute. En plus, et comme conséquence de la vie microbienne, ils perdent de l'acide carbonique et une petite quantité d'hydrogène sulfuré.

Nous avons tenté, au moyen d'expériences probantes, de démontrer l'existence de ces échanges et aussi d'évaluer leur importance.

Vapeur d'eau. — Le départ de vapeur d'eau est un fait absolument évident. La concentration du glycérol, ainsi que celle des ions sulfate dans un Sauton vierge maintenu à l'étuve à 38°C, suffisaient à nous donner une idée de la perte d'eau à l'état de vapeur. Des titrages effectués dans ce sens nous indiquaient, au bout de 6 semaines, un départ de 40 grammes d'eau environ; ce que nous pouvions aisément vérifier par la balance.

Cette perte, nous le répétons, se produit aussi bien dans les ballons témoins vierges que dans les ballons ensemencés, et d'une façon constante, au moins dans les limites de nos expériences.

Hydrogène sulfuré. — Qualitativement, il était aisé de munir tous nos ballons de papier à l'acétate de plomb plongeant dans l'atmosphère intérieure. Evidemment les papiers réactifs des ballons témoins n'ont pas changé, tandis que ceux des ballons ensemencés ont noirci progressivement au moment du développement microbien le plus intense, entre le septième et le vingt-huitième jours pour le B.C.G. et le B., un peu plus tard pour les deux autres. Il faut admettre que les germes réduisent une partie des ions sulfate du milieu à l'état d'hydrogène sulfuré.

Azote ammoniacal. — La seule façon pratique de reconnaître le départ de vapeurs ammoniacales était de plonger dans l'atmosphère des ballons une baguette de verre enduite d'un réactif sensible de l'ammoniac. Nous avons essayé ainsi l'emploi de l'acide chlorhydrique, qui donne des fumées blanches caractéristiques de chlorure d'ammonium, et le réactif de Nessler, qui donne une coloration jaune-rougeâtre avec des traces d'ammoniac.

J. Debiesse affirme qu'il a obtenu ces vapeurs blanches dans l'atmosphère des ballons de Sauton vierge, après trois semaines de séjour à l'étuve. Nous n'avons rien constaté de tel, et nous craignons que l'auteur n'ait pris pour des fumées blanches de chlorure d'ammonium, celles déjà abondantes d'hydrate d'acide chlorhy-

drique en atmosphère saturée d'humidité; et c'est précisément le cas des ballons en expérience.

Avec le réactif de Nessler, nous n'avons pas obtenu de résultat plus probant.

A notre avis, le départ de gaz ammoniac se fait pendant un temps assez long et à faible dose; pour cette raison nous ne croyons pas que sa présence soit décelable par un procédé aussi rudimentaire.

Nous nous en tiendrons aux données quantitatives qui suivront, pour établir nettement la perte d'ammoniac.

Acide carbonique. — Nous avons effectué des prélèvements d'air dans les ballons maintenus à l'étuve à 38° C. et nous avons fait barboter cet air dans de l'eau de chaux.

L'air des ballons vierges ne trouble pas l'eau de chaux;

L'air des ballons ensemencés la trouble abondamment.

Il y a donc bien dans ces derniers de l'acide carbonique qui n'existe pas dans les ballons non ensemencés.

Tous ces essais constituent une preuve suffisante de l'existence des échanges gazeux.

Spectres d'absorption des milieux ensemencés.

Nous rappellerons ici les caractères spectrographiques des milieux de Sauton non cultivés et cultivés en B.C.G., afin d'en rapprocher ceux des milieux cultivés avec les autres bacilles tuberculeux.

L'absorption des liquides de Sauton, très faible dans le spectre visible, augmente rapidement vers les courtes longueurs d'onde, pour devenir quasi-totale.

Sur les diagrammes obtenus au moyen du microphotomètre, la région spectrale dans laquelle l'absorption croît progressivement, région que J. Debiesse a désignée par « seuil d'absorption », a des limites assez variables. Ainsi le Sauton vierge présente, pour une cuve de 4 centimètres d'épaisseur, un seuil d'absorption bien défini entre 3920 et 3550 A, au delà duquel l'absorption devient totale. Dans le début du spectre visible, le microphotomètre permet de déceler une très légère bande entre 4860 et 4600 A.

Pour le Sauton ensemencé en B.C.G., le spectre d'absorption évolue en fonction du temps; le seuil d'absorption (3920-3550 A)

se déplace graduellement vers le spectre visible de 300 A (4220-3850 A) tandis que la bande située entre 4860 et 4600 A atteint son maximum d'intensité au moment même où l'activité microbienne est la plus grande (après trois semaines). Puis tout revient peu à peu à l'état initial, c'est-à-dire au spectre d'absorption du Sauton vierge, quand cesse l'évolution du voile microbien.

Les mêmes essais ont été tentés sur des milieux de Sauton ensemencés avec les autres bacilles tuberculeux : Humain, Bovin et Aviaire.

Les spectres d'absorption des milieux de Sauton cultivés en bacille B. et en bacille H. sont assez analogues; ils présentent une bande d'absorption vers 4800 A, entre le dixième et le vingtième jour de la culture. Le spectre du bacille B. se rapproche beaucoup de celui du Sauton cultivé en B.C.G. (4). Cela n'a rien de surprenant, quand on connait la parenté des deux bacilles.

Par contre le spectre d'absorption d'un milieu de Sauton cultivé en bacille A. est nettement différent des trois autres, ainsi que nous allons le constater :

Etude de la bande 4860-4600 A. — Pour les milieux cultivés en B. et en H., cette bande présente les mêmes caractères que dans le cas du B.C.G.; maximum d'intensité vers le 21e jour, puis retour à l'état initial.

Pour les milieux cultivés en bacille A., cette bande, très faible au début, n'augmente pas d'intensité; elle ne passe donc pas par un maximum, elle va s'affaiblissant du début à la fin, pour arriver à s'effacer totalement.

Etude du seuil d'absorption. — Tous les spectrogrammes obtenus avec les divers bacilles tuberculeux présentent une parenté certaine. Cependant une étude un peu détaillée permet de les différencier les uns des autres.

Pour tous les bacilles tuberculeux, le seuil d'absorption se déplace en bloc du côté des grandes longueurs d'onde, puis revient à sa position initiale au cours du temps. Si nous portons en abcisses les temps (en jours de culture) et en ordonnées les déplacements du seuil d'absorption (en Angströms) du côté du rouge, l'évolution du seuil peut être représentée par la courbe ci-contre :

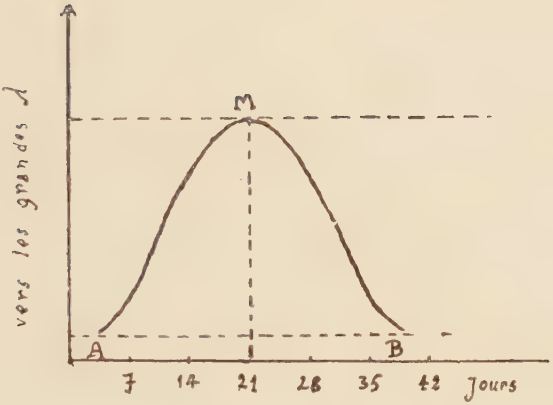


Fig. 2

Les différents bacilles peuvent alors être distingués par les coordonnées du point M. Les résultats moyens ont été schématisés dans l'ensemble de courbes ci-après, dont la superposition fait mieux ressortir les différences :

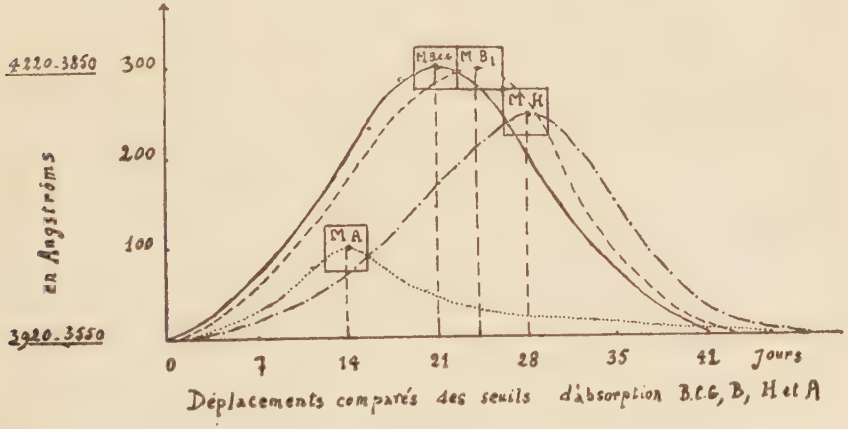


Fig. 3

Tandis que pour les bacilles B.C.G. et B. le seuil d'absorption est déplacé de 300 A. vers le 21e jour de la culture,

pour le bacille H. il est déplacé de 250 A. vers le 28e jour,

et pour le bacille A. de 100 A. seulement vers le 14e jour.

En résumé, les bacilles B.C.G., B. et H. présentent une évolu-

tion de leur seuil d'absorption de même amplitude à partir du 21e jour de la culture;

Le bacille A. présente une évolution du seuil beaucoup plus faible et se produisant dès le 14e jour.

Le bacille A. se distingue ainsi nettement des trois autres variétés de bacilles tuberculeux.

Tels sont les caractères purement physiques des milieux de Sauton ensemencés avec les divers bacilles tuberculeux.

Remarque importante. — Nous venons de signaler que le bacille A. présente un spectre d'absorption tout différent de celui des autres bacilles tuberculeux. Dans le spectre visible, en effet, on voit à peine la bande 4860-4600 A. et cette bande, au lieu de croître en intensité et passer par un maximum vers le 21e jour, comme pour le B.C.G., le B. et le H., décroît de suite de façon continue jusqu'à s'effacer presque totalement.

Nous avons fait le rapprochement de cette observation avec le fait que nous signalions plus haut, que le pH des cultures de bacilles A. descend de suite vers l'acidité, alors que celui des cultures des autres bacilles tuberculeux commence par devenir alcalin, avec un maximum de 7,5, pour redescendre ensuite graduellement à partir de la troisième semaine (voir les courbes comparées, fig. 1).

Il y aurait une relation bien établie entre le pH du milieu et son spectre d'absorption.

D'ailleurs, « Ch. Dhéré a reconnu que l'alcalinisation d'un milieu protéique déplace, en général, la bande d'absorption correspondante du côté le moins réfrangible (5). De nombreux chercheurs (6) ont trouvé également une liaison entre le pH d'un milieu et son spectre d'absorption.

« L'évolution du seuil d'absorption semble bien correspondre à l'évolution du pH des milieux de Sauton. Pendant que le milieu devient basique, le pH passant de 7,2 à 7,5, le seuil d'absorption se déplace vers le rouge; puis il revient vers le violet tandis que le pH devient progressivement acide et tend vers sa valeur minima. »

Tels sont les propres termes employés par J. Debiesse (7) dans sa thèse pour rendre compte de l'évolution du seuil d'absorption au cours du développement du B.C.G.

Il est assez curieux de constater que nos observations, en ce qui concerne le bacille A., viennent corroborer nettement cette interprétation. Si le bacille A. présente un spectre d'absorption si nettement différent de celui des autres bacilles tuberculeux, c'est que lui n'alcalinise pas son milieu de culture.

Influence du pH sur les variations du seuil d'absorption d'un milieu. — Y a-t-il vraiment une relation entre les variations du pH d'un milieu de Sauton et les déplacements de son seuil d'absorption vers le rouge ?

Quelques essais, dont l'idée nous a été suggérée par M. le Professeur Rose, ont été effectués en ce sens; les résultats obtenus nous ont permis de conclure à l'affirmative.

Un milieu de Sauton vierge, de pH : 7,2, nous a servi de point de départ. Nous l'avons soumis à l'épreuve du spectrographe dans des conditions très diverses :

d'abord à l'état neutre;

ensuite, après avoir modifié son pH, soit vers l'acidité, soit vers l'alcalinité, au moyen de solutions acide et alcaline de titres connus, dont l'effet avait été vérifié préalablement.

Les spectres d'absorption des milieux ainsi préparés, obtenus tous avec la même source (tube à H de Chalonges), ont été enregistrés sur un même film, conjointement avec un spectre de référence donné par l'arc à vapeur de mercure (voir planche 1).

Voici ces spectres d'absorption dans l'ordre des expériences; leur lecture gagnerait à être faite au moyen du microphotomètre.

1 —	Sauton vierge	pH : 7,2 —	neutre	témoin
2 —	—	pH : 6,7 —	acide	peu absorbant
3 —	—	pH : 7,5 —	alcalin	absorbant
3 bis —	Spectre de référence.			
4 —	Sauton vierge	pH : 8,4 —	plus alcalin ..	plus absorbant
5 —	—	pH : 5,4 —	plus acide ...	très peu abs.

L'alcalinisation du milieu rend les sels formés (sels des acides citrique, aspartique, etc.) plus absorbants que le citrate de fer ammoniacal, qui limite normalement la transparence du milieu vers les courtes longueurs d'onde.

L'acidification du milieu détruit partiellement le citrate de fer ammoniacal et rend le milieu d'autant moins absorbant vers l'U. V. que la solution initiale a été plus acidifiée.

Une appréciation rapide des déplacements enregistrés nous conduit aux conclusions suivantes :

1° une augmentation du pH de 0,3 déplace le seuil de 200 A vers le rouge;

— 1,2 — 250 A vers le rouge;

2° une diminution du pH de 0,5 déplace le seuil de 30 A vers le violet;

— 1,8 — 100 A vers le violet.

Les chiffres donnés ci-dessus n'ont rien d'absolu. Néanmoins ils suffisent à donner une idée très nette des déplacements du seuil d'absorption sous l'influence des variations du pH.

Il n'y a pas de proportionnalité entre les déplacements observés et les variations correspondantes du pH.

Si nous rapprochons ces déplacements de ceux enregistrés avec les cultures de B.C.G. et de B. (voir fig. 3), nous constatons qu'ils leur sont inférieurs de 100 A.

Or 100 A, c'est justement la valeur du déplacement du seuil en culture de bacille Av, qui n'alcalinise pas le milieu.

Ces 100 A représenteraient alors la part de déplacement du seuil dûe aux modifications organiques que l'évolution microbienne fait subir aux constituants du milieu.

CHAPITRE TROISIÈME

Masses microbiennes

Dans un nouveau tableau, tableau III, nous avons placé les chiffres représentant les poids de microbes secs, calculés au litre de milieu de Sauton, fournis par nos différents milieux.

Nous y faisons figurer également les chiffres moyens donnés par J. Debiesse pour le B.C.G.

Tableau III. — **Masses de microbes secs produits en fonction du temps**

Temps en jours	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Culture de B. C. G.	—	0,37	3,49	8,57	13,4	13,7	13,9			
Culture de H.	—	—	0,83	5,18	9,18	10,4	11,8	12,5	12,2	12,83
Culture de B_1	—	0,07	2,13	6,50	9,30	9,73	9,90	9,16	8,93	8,76
Culture de B_2	—	0,26	2,16	9,08	12,8	13,9	15	13,8	13·2	13
Culture de Av.	—	0,13	0,73	2,46	6,80	4,23	10,2	10,9	15	16,3

Il semble bien que l'augmentation de la masse des microbes ait une relation avec la perte de poids des ballons. Cela pourrait s'expliquer par le rejet important d'acide carbonique qui accompagne la prolifération des microbes et s'ajoute à la perte déjà considérable de vapeur d'eau.

Les plus grosses augmentations de masse microbienne doivent donc coïncider avec les plus grosses pertes de poids des ballons; c'est ce que l'on peut vérifier en confrontant les résultats des tableaux II et III.

Maximum de masse microbienne. — Fin d'évolution. — Une autre observation, qui n'est pas moins importante, peut être faite sur l'époque à laquelle la masse microbienne atteint son maximum. Or, cette époque paraît ne pas être la même pour tous les bacilles tuberculeux.

Pour le *B.C.G.*, le maximum a été observé au 42e jour avec 13,89 gr.; il ne se maintient pas après la sixième semaine, la masse microbienne diminuant légèrement après ce temps (lyse des microbes morts).

A remarqueur que, dès le 28e jour, le chiffre de masse microbienne est bien près du maximum.

En dehors des séries étudiées, nous avons pu examiner deux échantillons de B.C.G. ensemencés à la même date :

l'un, après 37 jours, présentait un pH égal à 5,9, avec 15, 17 gr. de microbes secs par litre (N p. 100 = 6,31);

l'autre, au bout de 50 jours, c'est-à-dire 8 jours après la fin de l'évolution, produisait 15,08 gr. au litre de microbes secs (N. p. 100 = 6,28).

Nous avons étudié deux double-séries de *bacille Bovin*, l'une B_1, ensemencée sur un milieu de Sauton qui, par suite d'une erreur de pesée lors de sa préparation, ne contenait que 45 gr. de glycérol et 3 gr. d'asparagine par litre, l'autre B_2, sur milieu de Sauton normal;

ces séries ont donné des masses maxima très différentes (9,90 pour la première, et 15,03 pour la seconde), d'ailleurs conformes aux teneurs respectives des milieux en substances nutritives.

Le maximum était encore atteint le 42e jour, comme pour le B.C.G.; une diminution très nette était constatée après le 42e jour dans les deux cas (voir tableau III).

Le fait ne prend-il pas une importance toute particulière, si nous rappelons que le bacille B.C.G. est un bacille Bovin atténué ?

Si nous considérons maintenant les *bacilles Humain et Aviaire*, nous constatons qu'ils atteignent leur maximum à la 9e semaine (63 jours), le bacille H. avec 12,83 gr., le bacille Av. avec 16,03 gr. La croissance de leur voile, plus lente au début, est arrivée à son maximum avec trois semaines de retard.

Au delà de la 9e semaine, la masse microbienne présente encore une légère diminution, analogue à celles observées après 6 semaines pour les cultures de B.C.G. et de B.

Toutes ces observations ont été représentées par des courbes, que nous avons superposées dans la *figure 4* (courbes superposées des masses microbiennes).

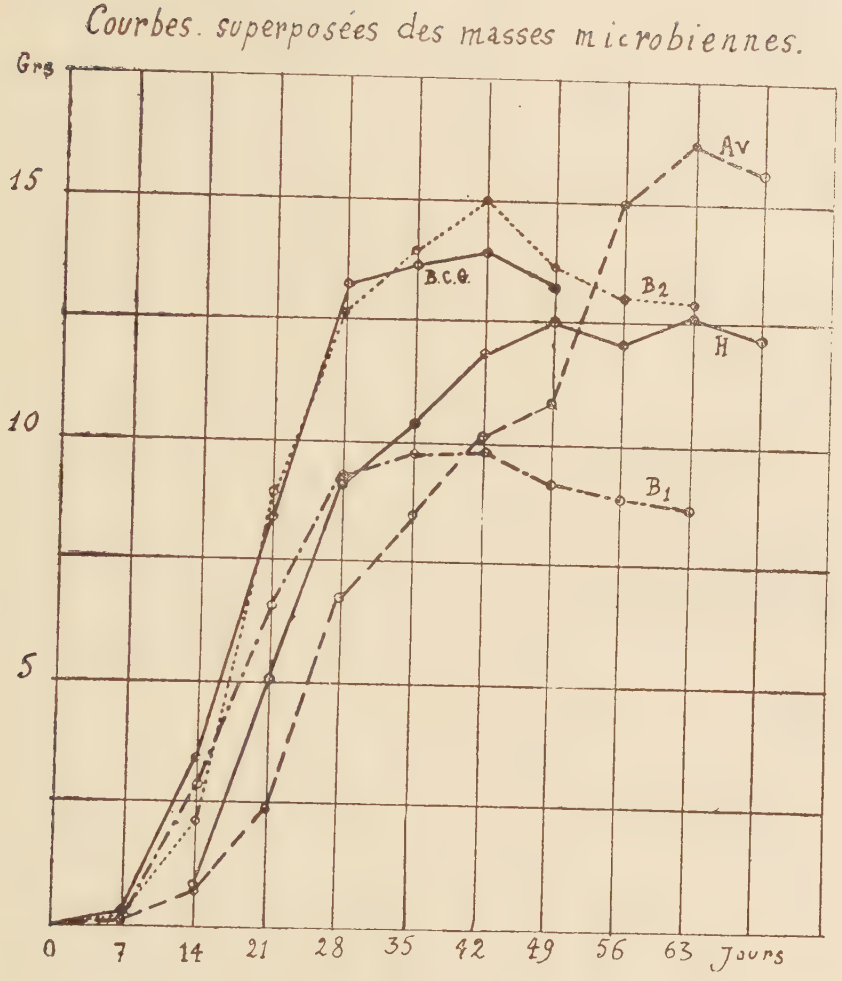


Fig. 4

Nous venons de parler d'une diminution très nette de la masse des microbes après le 42e jour ou le 63e jour suivant le bacille considéré. Il ne faut voir à cela rien d'anormal. Le voile étant arrivé à son complet développement, le milieu ne contenant plus, nous l'étudierons plus loin, assez de matière nutritive pour la formation de nouveaux germes, il y a arrêt de croissance. Par contre les microbes morts continuent à subir une lyse au moins partielle, ils perdent une bonne partie de leur substance qui passe dans le liquide. Il est donc tout compréhensible que nous consta-

tions une diminution de la masse microbienne dans les semaines qui suivent.

Durée de l'évolution microbienne. — Nous appellerons « durée de l'évolution microbienne » le temps écoulé depuis l'ensemencement jusqu'à l'obtention de la masse maxima de microbes (développement maximum).

Nos expériences nous ont révélé que la durée d'évolution n'est pas la même pour tous les bacilles tuberculeux; déduction intéressante qui nous a permis de ranger ces bacilles en deux groupes bien distincts :

1er groupe. — Bacille B. et B.C.G., dont l'évolution totale demande six semaines;

2e groupe. — Bacille H. et bacille Av., dont l'évolution totale demande neuf semaines.

Essai de diagnose des bacilles tuberculeux. — En faisant le rapprochement des différentes données établies par nous dans le chapitres précédents : acidification directe du milieu par le bacille Av., pH minimum et durée d'évolution, nous sommes à même d'établir un procédé de diagnose des 4 bacilles tuberculeux : B.C.G., H., B. et Av. Tableau IV.

Tableau IV. — **Diagnose des bacilles tuberculeux.**

1° pH monte à 7,5 pour redescendre ensuite	Evolution en 6 semaines	pH min. = 6 = B.C.G.
		pH min. = 5 env. = B.
	Evol. en 9 sem. : pH minim. voisin de 4 = H.	
2° pH descend directement	Evol. en 9 sem. : pH minim. voisin de 4 = Av.	

Le moyen est peut-être un peu long, mais en est-il un autre offrant plus de certitude ?

La diagnose, ainsi pratiquée, nécessite une dizaine de ballons contenant chacun 300 cc. de milieu de Sauton.

Ces ballons doivent être ensemencés en voile avec le bacille à déterminer. Ensuite ils sont mis à l'étuve à 38° C. et repris à raison de un par semaine, pour examen : détermination du pH et poids des microbes secs.

On connaîtra ainsi le sens de la marche du pH et sa valeur minima, de même que la durée d'évolution du voile.

Avec ces renseignements il suffira de se reporter au tableau précédent pour connaître le bacille.

Et maintenant, avant d'abandonner le chapitre des masses microbiennes, reprenons certaines conclusions de J. Debiesse (8).

« Les microbes morts, écrit-il, sont complètement lysés.

« Le développement s'interrompt, d'une part à cause du man-« que d'espace, d'autre part à cause de la diminution de la ration « alimentaire. »

Si les microbes morts étaient complètement lysés, il devrait y avoir suffisamment d'espace pour le développement des plus jeunes.

A notre avis, il y a là une contradiction.

Par contre, nous admettons parfaitement que la diminution de la ration alimentaire soit à la base de l'arrêt de la prolifération.

Nous ne pensons pas que les microbes morts puissent être complètement lysés. Certes, ils subissent cette lyse; leur substance, minérale ou organique, passe, en partie du moins, dans le milieu qui les baigne; mais il en reste toujours quelque chose, ne serait-ce que leur enveloppe plus résistante. C'est l'accumulation de ces résidus inertes qui finit par réduire l'espace si nécessaire à la vie des germes plus jeunes.

Nous apportons, à l'appui de notre thèse, la constation suivante : Dans la constitution d'une espèce microbienne, les proportions des divers éléments ne doivent pas subir de bien grosses variations. Or, au cours de nos expériences, nous avons pu remarquer que le taux d'azote des masses microbiennes desséchées diminue graduellement à partir de la 4e semaine jusqu'en fin d'évolution (6 ou 9 semaines suivant le cas). Nous expliquons la chose en admettant, dans la masse microbienne, la présence d'une proportion sans cesse grandissante de microbes morts; ceux-ci, ayant déjà laissé échapper une partie de leur substance azotée au profit du liquide environnant, abaissent progressivement le taux d'azote de l'ensemble.

Nous pensons que nous n'aurions pas à observer cette baisse du taux d'azote, si la masse n'était composée que de germes bien vivants, autrement dit si la lyse avait complètement supprimé les germes morts.

En plus des deux causes d'arrêt du développement données ci-dessus (manque d'espace et manque de nourriture), il y a lieu de

considérer également l'influence possible des déchets accumulés dans le milieu.

Influence des déchets accumulés dans les milieux. — Quelle est cette influence ? ou plutôt quelle part d'influence revient aux déchets dans l'arrêt du développement microbien ?

Quelques essais, tentés sur la demande de M. le Professeur M. Rose, nous ont conduit à des résultats très incertains. Ces essais furent pratiqués avec le Docteur P. Durand, dans son Service du B.C.G. ,à l'Institut Pasteur.

Nous prenions un milieu en fin d'évolution.

Après filtration, nous l'additionnions des quantités de substances nutritives disparues lors de la précédente évolution (ces quantités étaient connues par l'analyse); nous le ramenions au volume primitif, et l'ensemencions à nouveau avec une portion de voile de B.C.G.

Le même ensemencement était fait, parallèlement, sur du Sauton neuf, en vue de la préparation du B.C.G.

Cette opération a été pratiquée, cinq à six fois de suite, sur différents milieux épuisés.

Mais, bien que le milieu de Sauton fût le même, nous n'obtenions plus de façon régulière la formation du voile; celui-ci n'apparaissait souvent qu'avec un retard considérable, sur les milieux neufs, et avec un retard encore accru sur nos milieux reconstitués; peut-être faut-il incriminer les pommes de terre utilisées, qui étaient de mauvaise qualité ?

Nous ne croyons cependant pas pouvoir tirer de nos expériences une conclusion précise.

Le seul fait indéniable, c'est que la présence des déchets dans le milieu n'empêchait pas le développement microbien; nous avons obtenu, avec retard il est vrai, des voiles comparables à ceux obtenus sur Sauton normal.

En admettant donc que les déchets soient une gêne pour le développement microbien, ils paraissent ne pas l'empêcher. Ce serait surtout, à notre avis, le manque de nourriture qui provoquerait l'arrêt de ce développement.

DEUXIÈME PARTIE

Essais quantitatifs

CHAPITRE PREMIER

Essai d'une étude quantitative des échanges gazeux

Nous avons démontré, dans un chapitre précédent, l'existence des échanges gazeux entre le milieu de Sauton et l'atmosphère environnante. Nous allons essayer maintenant de mesurer la valeur de ces échanges.

Vapeur d'eau. — Le départ d'eau à l'état de vapeur est un fait constant. Dès qu'un milieu est placé à l'étuve à 38° C., et tant qu'il y demeure, ensemencé ou non, il perd régulièrement une certaine quantité d'eau par évaporation.

Dans le cas d'un milieu ensemencé, outre la vapeur d'eau, se dégage une masse appréciable de gaz carbonique. Nous ne pouvions envisager un dosage précis de l'eau disparue.

Il nous suffisait d'ailleurs de connaître la quantité de liquide demeurée dans chaque ballon, au moment de l'analyse, pour ramener le taux des éléments dosés à la contenance primitive de 300 cc. de Sauton.

Hydrogène sulfuré. — Un essai quantitatif nous a paru impossible dans les conditions de nos expériences; nous nous bornerons à supposer le départ, à l'état d'hydrogène sulfuré, de tout le soufre que nous n'avons pas retrouvé, tant dans le milieu que dans la masse microbienne, c'est-à-dire 0,013 gramme de soufre par litre.

Ce chiffre représente un maximum de 14 milligrammes, soit environ 9 cc. d'hydrogène sulfuré par litre de Sauton, qui s'échapperaient et marqueraient leur passage, en noircissant le papier réactif placé dans le col du ballon.

Azote ammoniacal. — Quantitativement, nous avons pu connaître la valeur du départ d'azote ammoniacal par des dosages d'azote total faits, de semaine en semaine, sur le contenu des ballons étuvés.

C'est ainsi que nous avons pu évaluer cette perte à 0,100 gramme par litre de milieu pour les ballons de Sauton vierge, après six semaines de séjour à l'étuve.

Acide carbonique et oxygène. — Pour avoir une idée de la quantité d'acide carbonique cédée par le milieu à l'atmosphère environnante, et de la quantité d'oxygène fournie par cette atmosphère au milieu, nous ne pouvions nous contenter d'analyser l'air de l'atmosphère interne des ballons. Il n'est pas douteux, en effet, que les échanges gazeux se font aussi avec l'air extérieur, au travers du bouchon de coton.

Il fallait imaginer un appareil clos, contenant une réserve d'air suffisante pour permettre la vie et le développement du voile microbien, du moins pendant un certain temps.

L'appareil que nous avions réalisé, et que J. Debiesse a présenté dans son mémoire, était ainsi conçu :

Un ballon B_1, à tubulure latérale, était mis en communication, par ses deux ouvertures, au moyen des tubes t_1 et t_2, avec une bonbonne B_2.

L'un des tubes, t_1, était muni, sur son parcours, d'une poire en caoutchouc à soupape, pouvant puiser l'air de la bonbonne et le refouler dans le ballon.

L'autre tube, t_2, partant de la tubulure latérale, juste au-dessus du niveau du milieu de Sauton, pénétrait dans la bonbonne jusqu'à mi-hauteur. Il assurait librement le passage de l'air du ballon à la bonbonne et inversement.

L'appareil tout monté présentait une capacité se répartissant ainsi :

Ballon B_1	1.050 cc.
Bonbonne B_2	21.750 —
Tubes t_1 et t_2	260 —
soit un total de.....	23.060 cc.

Ballon et bonbonne étaient munis chacun d'un troisième tube t_3 et t_4, avec robinets r_1 et r_2, pouvant faire communiquer à volonté l'air intérieur avec l'extérieur. C'est par ces tubes que l'on pouvait prélever l'air du ballon ou de la bonbonne.

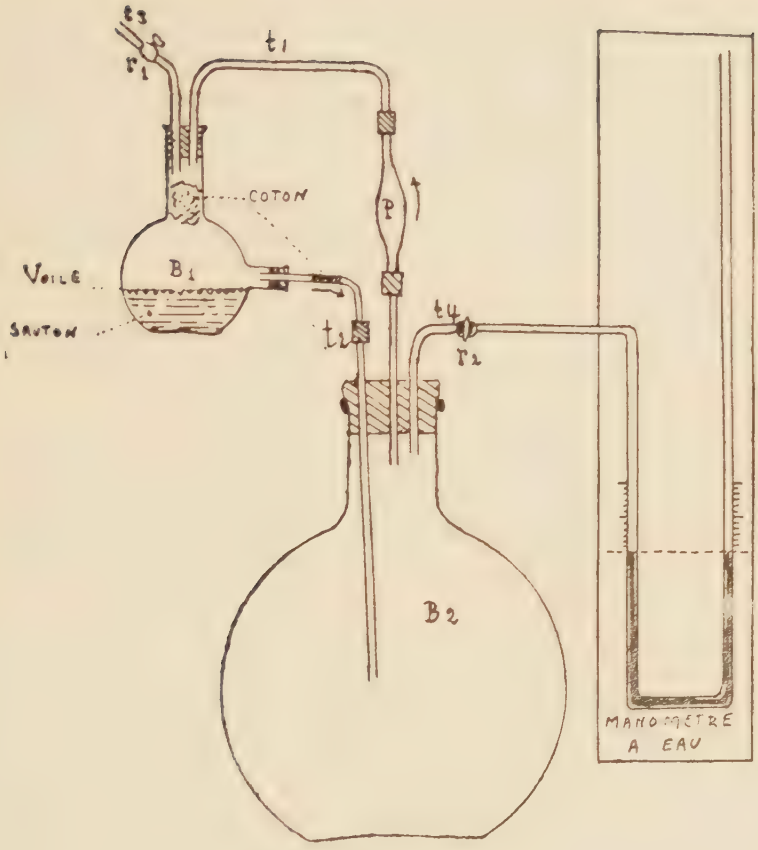


Fig. 5

Le tube t_4 était branché sur un manomètre à eau, qui permettait de connaître constamment les variations de pression à l'intérieur de l'appareil.

Le ballon B_1 pouvait se séparer de l'appareil, avec une portion du tube t_2. Des bouchons de coton cardé garnissaient les deux orifices, un dans le col même du ballon, un autre dans le tube t_2 fermant la tubulure latérale. Ces bouchons de coton étaient destinés à assurer la stérilité de l'intérieur du ballon.

Le ballon B_1 recevait 300 cc. de Sauton vierge, puis était soigneusement bouché au coton et porté à l'autoclave. Après stérilisation et refroidissement, il était ensemencé en voile avec le bacille H., en prenant toutes les précautions d'usage.

On portait le ballon à l'étuve à 38° C., où il était adapté à l'en

semble de l'appareil. Après avoir enfoncé profondément le tampon de coton dans le col, ce dernier était garni de son bouchon portant les tubes t_1 et t_3. Le tube t_1 était raccordé à la poire et maintenu par un bon enroulement de toile isolante; le tube t_2 était rejoint au tube correspondant par un bon caoutchouc à vide.

Les robinets r_1 et r_2 étaient laissés ouverts quelques minutes, pour établir l'équilibre entre l'atmosphère interne de l'appareil et celle de l'étuve.

Le manomètre était branché sur le tube t_4.

Enfin on fermait les deux robinets r_1 et r_2 et l'on abandonnait le tout.

Chaque jour l'appareil était visité. On ouvrait un instant le robinet r_2, juste le temps de se rendre compte de la pression à l'intérieur et de la mesurer; puis on pressait à fond quatre ou cinq fois la poire de caoutchouc pour renouveler l'air du ballon avec celui de la bonbonne B_2, et assurer l'homogénéité de l'atmosphère de tout l'ensemble.

Au début de l'opération, les microbes avaient à leur disposition une réserve d'air de 23.060 — 300 = 22.760 cc., ce qui représente, en volume, 4.780 cc., ou en poids, 6,85 grammes d'oxygène. Cette quantité permettait d'assurer le développement du voile microbien pendant un certain temps, au bout duquel nous devions, après analyse de l'air de l'atmosphère de l'appareil, renouveler entièrement celle-ci avec de l'air du dehors. Pour cela il suffisait de débrancher le manomètre, d'ouvrir les deux robinets r_1 et r_2, et de faire un balayage d'air par les deux tubes t_3 et t_4, pendant une bonne demi-heure.

Après fermeture des robinets r_1 et r_2, l'appareil était à nouveau prêt à assurer la marche de l'évolution du voile.

A noter que nos trois bouchons étaient des bouchons de caoutchouc à l'état de neuf. Les passages des tubes dans ces bouchons étaient enduits d'un bon lut, la picéine, qui en assurait la parfaite étanchéité.

Nous avons relevé avec soin les pressions indiquées par le manomètre à eau, et avons constaté que les différences de quelques millimètres d'eau observées en plus ou en moins, dépendaient des variations de la pression extérieure. Nous avons donc admis que nous opérions constamment à une pression très voisine de la pression atmosphérique.

Prélèvements d'air à l'intérieur de l'appareil. — Nous avons utilisé un aspirateur fait de deux flacons portant chacun deux tubes, l'un allant au fond du flacon, l'autre s'arrêtant au ras du bouchon. Les deux tubes plongeants étaient réunis par un tube de caoutchouc muni d'une pince. Les deux autres tubes étaient terminés chacun par un tube de caoutchouc également muni d'une pince. Fig. 6.

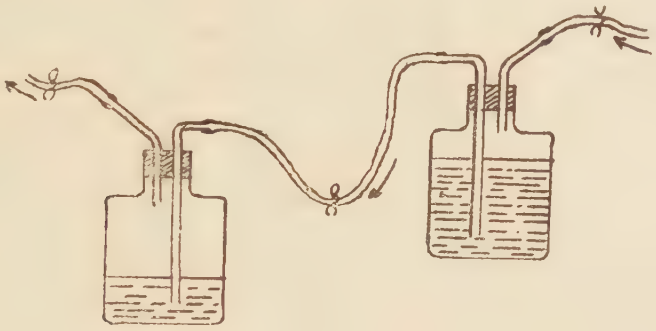


Fig. 6

Si on remplissait entièrement d'eau un des flacons, il suffisait d'abaisser l'autre, toutes pinces ouvertes, pour établir, par siphonnage, un passage d'eau du premier dans le second, d'où aspiration d'air.

En faisant jouer convenablement les pinces, on pouvait aisément prélever par aspiration les quantités d'air que l'on voulait, soit au tube t_3 (ballon), soit au tube t_4 (bonbonne).

En faisant la manœuvre inverse, on pouvait faire passer l'air prélevé de l'aspirateur dans un autre récipient ou dans l'éprouvette graduée de l'appareil qui sert à en faire l'analyse.

Analyse de l'air. — Nous avons utilisé tout d'abord l'appareil de Hahn, puis celui de Vignon. Tous deux, basés sur le même principe, sont composés d'une éprouvette graduée pour le mesurage de l'air, pouvant communiquer à volonté, soit avec un des tubes absorbeurs, soit avec un tube à combustion.

Les tubes absorbeurs de l'appareil de Hahn fonctionnent par barbotage de l'air dans le liquide absorbant, qu'il parcourt de bas en haut. L'absorption y est plus rapide que dans les absorbeurs de l'appareil de Vignon, où l'air ne fait que prendre contact avec le liquide, dont la surface est multipliée par un faisceau de tubes de verre mince.

Par ailleurs, l'appareil de Vignon, comportant uniquement des robinets à deux voies, est d'une manipulation beaucoup plus simple que celui de Hahn, avec ses robinets à trois voies, causes de fréquentes erreurs de manœuvre.

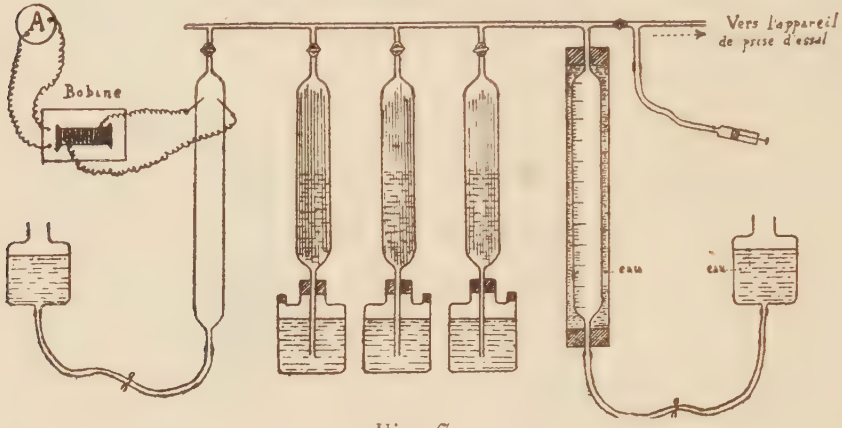


Fig. 7

L'appareil comporte donc :

Un tube gradué au demi-centi-cube, pour le mesurage des gaz;

Trois tubes absorbeurs, pour la potasse, le pyrogallate et le chlorure cuivreux;

Un tube à combustion, avec sa bobine de Ruhmkorff et son accumulateur;

Deux flacons à eau et tubes de caoutchouc, pour faire circuler les gaz;

Une petite pompe aspirante, pour enlever les dernières portions d'air entre le robinet d'entrée de l'appareil et la pince de sortie du flacon à prélèvement.

Disons de suite que nous avons fait des essais de combustion sur l'air de notre appareil à culture en atmosphère close. Cet air, débarrassé de son gaz carbonique et de son oxygène, était mélangé, à volume égal (40 et 40 cc.) d'oxygène, et le mélange soumis, dans le tube à combustion, à l'action prolongée de l'étincelle électrique.

Le mélange ainsi traité n'avait pas changé de volume. Après absorption de l'oxygène, nous retrouvions notre volume primitif de 40 cc., que nous considérons comme entièrement composé d'azote.

Ainsi nous n'avons pas trouvé trace de gaz combustible. L'hydrogène sulfuré figure en trop petite quantité pour être déterminé ainsi quantitativement.

Nos analyses d'air se sont donc bornées aux dosages de l'acide carbonique et de l'oxygène. Nous obtenions l'azote par simple différence.

Solutions employées :

1° *Potasse caustique* à 33 pour 100 en poids, solution pouvant absorber 40 fois son volume d'acide carbonique.

2° *Pyrogallate de potasse :*

Pyrogallol	15 grammes
Eau	50 cc.
Potasse à 33 %	250 cc.

solution capable d'absorber 2 fois son volume d'oxygène.

Manipulation. — Tous nos essais d'analyse étaient faits sur 100 cc. d'air, entre 18 et 20 degrés centigrades.

L'appareil étant tout prêt à l'usage, c'est-à-dire les tubes absorbeurs étant remplis, jusqu'au trait de repère 0, de leur liquide respectif (potasse ou pyrogallate de potasse), le tube gradué étant rempli d'eau jusqu'au repère 0, on ajustait au tube d'entrée le tube de sortie du flacon de prise d'essai; avec la petite pompe à main on enlevait l'air des portions de tubes ainsi ajustées. On ouvrait alors les pinces du flacon à prélèvement et le robinet qui commande l'entrée de l'appareil; puis on faisait entrer, par aspiration, l'air à analyser, dans le tube gradué. On s'arrêtait quand on avait un volume d'air supérieur à 100 cc. On fermait le robinet d'entrée, on fermait le flacon à prélèvements que l'on détachait de l'appareil, et l'on ramenait doucement le volume d'air, inclus dans le tube gradué, à 100 cc. exactement et à la pression atmosphérique.

Par un jeu de robinets facile à saisir, et en élevant ou abaissant successivement le flacon d'eau, on faisait circuler l'air, d'un mouvement de va-et-vient, dans le tube absorbeur à potasse, où il abandonnait son acide carbonique.

On rassemblait la totalité de l'air dans le tube gradué, et, lorsqu'on ne constatait plus de diminution de volume (ce qui se produisait après une quinzaine de mouvements aller et retour), on amenait cet air à la pression atmosphérique en égalisant les niveaux des liquides dans le tube gradué et dans le flacon d'eau. Alors, on lisait exactement le volume restant.

C'est ce volume d'air que l'on faisait passer ensuite dans le tube

absorbeur à pyrogallate, comme dans le précédent, une quinzaine de fois environ. A nouveau on faisait la lecture dans le tube gradué, à la pression atmosphérique. Ce volume représentait l'azote des 100 cc. d'air.

Les pertes par absorption, dans les solutions de potasse et de pyrogallate, représentaient les volumes respectifs d'acide carbonique et d'oxygène de ces mêmes 100 cc. d'air.

C'est à ce moment que l'on pouvait faire l'essai de combustion sur le gaz resté dans le tube gradué, gaz que nous avons été amené à considérer comme de l'azote seul.

Résultats obtenus :

Analyse de l'air de l'étuve à 38° C., *le jour de la mise en route de l'expérience*

Prise d'essai, au départ ..... 100 cc.
0 cc. d'CO^2
Volume après absorption de CO^2 ..... 100 cc.
20 cc. d'O
Volume après absorption d'O ..... 80 cc.
et 80 cc. d'N

1re phase

I. — Analyse de l'air du ballon B_1, *après 11 jours de culture*

Prise d'essai, au départ.... 100 cc.
4 cc. d'CO^2
Volume apr. absorpt. de CO^2 96 cc.
14 cc. d'O
Volume après absorption d'O 82 cc.
et 82 cc. d'N

II. — Analyse de l'air du ballon B_1, *après 23 jours de culture*

Prise d'essai, au départ.... 100 cc.
8 cc. d'CO^2
Volume apr. absorpt. de CO^2 92 cc.
10 cc. d'O
Volume après absorption d'O 82 cc.
et 82 cc. d'N

III. — Analyse de l'air du ballon B_1 et de la bonne B_2, *après 32 jours de culture*

Prise d'essai, au départ.... 100 cc.
9,5 cc. d'CO^2
Volume apr. absorpt. de CO^2 90,5 cc.
8,5 cc. d'O
Volume après absorption d'O 82 cc.
et 82 cc. d'N

Ce jour-là nous avons renouvelé entièrement l'air de l'appareil et remis l'expérience en marche pour une nouvelle période :

2e phase

I. — Analyse de l'air du ballon B_1, *après 38 jours de culture*

Prise d'essai, au départ....	100 cc.		
		13,5 cc.	d'CO^2
Volume apr. absorpt. de CO^2	86,5 cc.		
		3 cc.	d'O
Volume après absorption d'O	83,5 cc.		
		et 83,5 cc.	d'N

II. — Analyse de l'air du ballon B_1 et de la bonbonne B_2, *après 63 jours de culture*

Prise d'essai, au départ....	100 cc.		
		13,75 cc.	d'CO^2
Volume apr. absorpt. de CO^2	86,25 cc.		
		3 cc.	d'O
Volume après absorption d'O	83,25 cc.		
		et 83,25 cc.	d'N

L'air de l'appareil était bien homogène; les analyses faites sur la bonbonne B_2, en même temps que sur le ballon B_1, à la fin des deux phases, nous l'ont prouvé.

Par ailleurs nous remarquons que l'évolution était largement terminée le 38e jour de la 2e phase, soit 70 jours à partir du début de l'expérience.

Remarque — Dans toutes nos analyses, le volume d'oxygène disparu est nettement supérieur à celui d'acide carbonique formé. Une certaine quantité d'oxygène a donc été fixée par la culture (milieu et microbes).

Une des conséquences de cette fixation d'oxygène est l'enrichissement apparent de l'air en azote. Nous trouvons, en effet, des chiffres d'azote de plus en plus élevés, allant jusqu'à 83,25 cc. pour 100.

Nous ferons remarquer que les chiffres d'azote ainsi obtenus n'ont rien d'absolu.

Interprétation. — Les résultats ci-dessus ne sont que des résultats d'analyses effectuées sur 100 cc. d'air. Nous allons les traduire en litres, non plus pour 100 cc., mais pour le volume total de notre appareil clos, soit 22,760 litres.

N'oublions pas que ces chiffres ne correspondent encore qu'à 300 centi-cubes de milieu de Sauton mis en expérience :

Tableau V. — **Echanges gazeux pour 300 cc. de Sauton ensemencés en H.**

Temps en jours		CO^2 formé	O disparu	O devenu CO^2	O fixé
1° phase	après 11 jours	0 lit. 910	1 lit. 594	0 lit. 661	0 lit. 933
	après 23 jours	1 lit. 820	2 lit. 504	1 lit. 325	1 lit. 181
	après 32 jours	2 lit. 162	2 lit. 846	1 lit. 572	1 lit. 274
2° phase	après 38 jours	3 lit. 072	4 lit. 098	2 lit. 234	1 lit. 864
	après 63 jours	3 lit. 129	4 lit. 098	2 lit. 275	1 lit. 823
Total après 95 jours (1° + 2° phase)		5 lit. 291	6 lit. 944	3 lit. 847	3 lit. 097

Après 32 jours, la culture semblait ralentie ou arrêtée; elle se trouvait dans une atmosphère contenant 9,5 % de gaz carbonique et 8,5 % d'oxygène, ce qui concorde avec les remarques faites par J. Debiesse.

Mais n'oublions pas que nous avons affaire au bacille H., dont l'évolution n'est à son terme que le 63e jour, dans les conditions normales à l'air libre. Dans la seconde phase de l'expérience, nous devions avoir encore de gros échanges; ils ont même été supérieurs à ceux de la première phase.

La deuxième phase s'est terminée en présence de 13,75 p. 100 d'acide carbonique et 3 p. 100 d'oxygène. L'utilisation de l'oxygène a été poussée à son maximum.

Si nous considérons l'ensemble de l'expérience, en calculant les échanges en grammes par litre de Sauton ensemencé, nous arrivons au bilan suivant :

La masse d'acide carbonique formé est de 25,272 grammes;

La masse de microbes secs est de 10,966 grammes au litre de milieu;

L'évolution du voile, c'est-à-dire la formation des 10,966 grammes de microbes a nécessité l'emploi de 33,18 grammes d'oxygène;

Sur ces 33,18 grammes d'oxygène, 18,38 gr. ont servi à former les 25,272 grammes d'acide carbonique;

Le reste, c'est-à-dire 14,80 grammes d'oxygène, a été fixé par la culture (milieu et microbes).

Par ailleurs nous avons trouvé que les microbes avaient utilisé :

58,5 p. 100 du glycérol, soit 35,1 gr. de glycérine à 96 p. 100;

64,8 p. 100 du sulfate de magnésie, soit 0,324 gramme;

58 p. 100 du phosphate bipotassique, soit 0,297 gramme.

Il semble que la quantité de glycérine consommée soit légèrement inférieure à celle consommée par une culture à l'air libre. Cela concorderait bien avec le pH final, trouvé moins acide que dans tous nos autres essais (6,2 au lieu de 4,5 pour un même temps de culture).

La limitation de la ration d'oxygène paraît bien être la cause d'une oxydation moins avancée, donc d'une acidification moindre du milieu.

Enfin, le taux d'azote de constitution des microbes secs, formés dans cette expérience, était de 7,74 pour 100, ce qui est en parfait accord avec les taux d'azote que nous avons trouvés par ailleurs, à l'air libre. La culture en atmosphère fermée semble donc ne pas avoir d'influence sur la composition centésimale des microbes.

CHAPITRE DEUXIÈME

Étude chimique quantitative des éléments hydrocarbonés

(Consommation de l'acide citrique et du glycérol)

Acide citrique

L'acide citrique a pour formule : $C^6H^8O^7 + H^2O$.

Sa formule développée se représente ainsi :

$$\begin{array}{l} CH^2 - COOH \\ | \\ OH - C - COOH + H^2O \\ | \\ CH^2 - COOH \end{array}$$

Il est à la fois alcool tertiaire et triacide.

Il entre dans la préparation du milieu de Sauton au taux de 2 grammes pour un litre.

Les acides organiques qui ont la particularité de présenter une fonction alcoolique tertiaire à proximité d'un radical carboxyle, soumis à l'action de l'acide sulfurique concentré, perdent, suivant la règle habituelle, les éléments de l'acide formique ($H^2 + CO$), avec formation d'une fonction cétonique. Ce caractère se vérifie remarquablement pour l'acide citrique, qui donne, dans ces conditions, de l'acide acétone-dicarbonique :

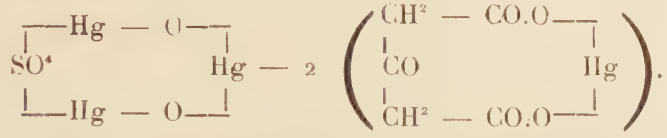
$$\begin{array}{l} CH^2 - COOH \\ | \\ CO \\ | \\ CH^2 - COOH \end{array}$$

(ac-acétone-dicarbonique)

Cette propriété a été utilisée par A. Berg et C. Gerber pour la recherche de l'acide citrique dans les végétaux.

Denigès (9), en 1902, a indiqué que le permanganate de potassium se prête encore mieux et plus aisément que l'acide sulfurique à la transformation de l'acide citrique en acide acétone-dicarbonique.

Si on utilise, en outre, la propriété, signalée également par Denigès, que possède l'acide acétone-dicarbonique de fournir, avec la plus grande facilité, avec le réactif au sulfate mercurique une combinaison insoluble :



on a un moyen très pratique de caractériser directement et en quelques instants l'acide citrique dans les conditions les plus variées, en particulier dans les vins.

Dans l'application (10), et pour des solutions citriques moyennement concentrées, on porte à l'ébullition 5 cm3 de solution à essayer, après l'avoir mélangée avec 1 cm3 de réactif de Denigès (sulfate mercurique), puis, retirant du feu, on ajoute quelques gouttes de permanganate de potassium à 2 p. 100.

En cas de présence d'acide citrique, le mélange commence à se décolorer, et aussitôt après, il se forme un trouble ou un précipité blanc.

Pour les solutions très étendues, on n'ajoute à la solution que le dixième de son volume de réactif de Denigès, et une seule goutte de permanganate. Avec les très grandes dilutions, il est préférable d'employer le permanganate plus étendu.

Tels sont les éléments qui ont servi à Denigès pour donner un procédé de dosage, ou mieux d'évaluation de l'acide citrique dans les liquides comme le vin. C'est ce procédé que nous avons choisi, pour l'appliquer directement au milieu de Sauton dans les conditions suivantes :

Nous ajoutions à 10 cm3 de liquide (milieu de Sauton), 2 cm3 de la solution de sulfate mercurique :

Réactif de Denigès	oxyde rouge de mercure	5 grs.
	acide sulfurique concentré	20 cm3
	eau	100 cm3

Nous agitions et jetions sur un filtre.

Dans un tube à essais, nous mettions 5 cm3 du liquide filtré, nous portions à l'ébullition et ajoutions 1 goutte de permanganate de potassium à 1 p. 100; après décoloration, nous ajoutions une autre goutte de permanganate, et ainsi de suite jusqu'à X gouttes.

A la dose de 0 gr. 10 d'acide citrique par litre, le trouble est nettement accusé; à partir de 0 gr. 40 d'acide citrique, il est accompagné d'un précipité floconneux. Nous n'avions plus alors qu'à faire des essais comparatifs avec des solutions à titre connu d'acide citrique pour obtenir une évaluation de cet acide. La meilleure solution type que nous pouvions prendre était un milieu de Sauton neuf, à 2 gr. d'acide citrique par litre; étant donné que nous n'avions, pour faire une bonne comparaison, que l'intervalle 0,10 à 0,40 par litre, au-dessus duquel il se forme un précipité floconneux, nous ne pouvions pas songer à établir une gamme étendue. Nous nous bornions donc à faire la réaction sur 10 cc. de dilution au 1/10 du milieu neuf, contenant 0,20 d'acide citrique par litre, et recherchions quelle dilution du milieu à examiner donnait, dans les mêmes conditions, un trouble comparable, c'est-à-dire formait la même quantité d'acide acétone-dicarbonique.

Nous avons pu ainsi nous rendre compte, au moins d'une façon relative, de la consommation en acide citrique de nos différentes cultures.

Les chiffres de concentration que nous avons trouvés ne descendaient jamais au-dessous de 1,2 gr. par litre.

Nous n'avons donc pu constater de consommations supérieures à 50 p. 100, c'est-à-dire supérieures à 1 gr. par litre de milieu.

Cette consommation est faible. Il faut admettre toutefois que la présence de l'acide citrique dans le milieu est indispensable. Nous en avons fait la preuve de la façon suivante :

Nous avons préparé quatre ballons de milieu de Sauton :

Deux de composition absolument normale;

Deux dans lesquels nous avions supprimé l'acide citrique; tous amené au pH 7,2 environ.

Nous avons ensemencé les quatre ballons en B.C.G. et les avons placés à l'étuve à 38° C.

Les deux ballons de Sauton normal ont donné un développement régulier du voile, tandis que les ballons sans acide citrique, après un départ qui semblait normal, n'ont pas donné le développement du voile.

Que devient, maintenant, le gramme d'acide citrique ainsi consommé par les 13 à 15 grammes de microbes qui ont pris naissance dans un litre de Sauton ? Nous essaierons de le déterminer plus loin.

Glycérol

Le glycérol est un trialcool de formule

$$C^3H^8O^3 \text{ ou } CH^2OH — CH.OH — CH^2OH$$

Le milieu de Sauton en renferme 60 grammes en principe. Nous disons « en principe » parce que nous utilisions, pour nos milieux, une glycérine Codex, qui était pure, mais pas anhydre.

Sa densité, prise au flacon, était de 1,253, ce qui correspond à une glycérine à 96 pour 100 de glycérol.

Pour pratiquer le dosage du glycérol, nous avions à notre disposition deux méthodes :

la méthode gravimétrique de Laborde et la méthode chromométrique de Nicloux.

Méthode de Laborde (11). — De tous les procédés proposés pour le dosage de la glycérine (dans les vins), celui de Laborde est un des deux seuls qui donnent des résultats sensiblement exacts. Mais la technique en est longue et demande à être minutieusement appliquée dans tous ses détails (Denigès).

On introduit 50 cm3 du liquide à doser (pour nous c'est le milieu de Sauton) dans un matras de 200 cm3, avec 100 grammes de grains de plomb n° 4 et un peu de limaille de zinc, pour favoriser l'ébullition. On distille; quand il n'y a plus que 2 à 3 cm3 de liquide dans le matras, on laisse refroidir, on ajoute par fractions 2 à 3 grammes de chaux éteinte en poudre fine, et on agite de façon à avoir une masse très divisée enrobant les grains de plomb. On verse alors dans le matras 75 cm3 d'un mélange de deux volumes d'éther pour un d'alcool, et on imprime au plomb un mouvement d'agitation pour détacher les parcelles calcaires attachées aux parois et aux grains, et les mettre en suspension dans le liquide. On décante sur un filtre sans plis, on lave une ou deux fois avec le même mélange éther-alcool et on a une dissolution de glycérine à peu près pure, qu'on évapore pour peser le résidu.

L'évaporation est très délicate. Au dessicateur à acide sulfurique, il n'est pas sûr que la glycérine se débarrasse entièrement de son humidité; dessécher au bain-Marie est bien risqué, la glycérine se volatisant lentement à 100°. En faisant des pesées fréquentes, on saisira le moment où les pertes, devenues minimes (1 milligramme en une demi-heure) appartiendront à la glycérine seule. C'est à ce moment qu'on aura le poids de glycérine à 1 ou 2 milligrammes près.

La pesée devra être faite avec la plus grande rapidité, car la glycérine est aussi avide d'eau que l'acide sulfurique.

Pour éviter les incertitudes dûes à l'évaporation, Laborde a proposé de remplacer la pesée de la glycérine par celle du charbon qu'on peut en tirer au moyen de l'acide sulfurique, en vertu de la réaction suivante :

$$C^3H^8O^3 + S\,O^4H^2 = S\,O^2 + 5\,H^2O + 3\,C$$

Pour que cette réaction se fasse bien, il faut quelques précautions, qui sont ainsi résumées par l'auteur :

La solution de glycérine, fournie par le procédé d'extraction ci-dessus et contenant 1 gramme au plus et 0,1 gramme au moins de ce corps, est introduite dans un matras de 250 cm3 à fond plat, avec 10 gouttes d'acide sulfurique, et concentrée au bain de sable. La glycérine est entièrement maintenue par l'acide sulfurique pendant l'ébullition. Lorsqu'il ne reste plus que 2 cm3 environ de liquide dans le matras, on ajoute 6 cm3 d'acide sulfurique concentré, on ferme avec un bouchon de caoutchouc portant un tube de 50 cm. de hauteur, effilé et ouvert à son extrémité supérieure, taillé en biseau à l'autre extrémité, et l'on chauffe au bain de sable de façon que, en une minute au plus, la température du liquide ait atteint 150 degrés au moins. A ce moment une réaction vive commence dans le liquide, qui a noirci fortement, il se dégage de l'acide sulfureux et des vapeurs blanches d'eau et d'acide sulfurique. La température monte aux environs de 200 degrés et s'y maintient à peu près fixe, grâce à l'eau condensée qui retombe dans l'acide, où elle entretient l'ébullition et favorise la décomposition de la glycérine. Dès que la réaction est bien en train, il n'est pas nécessaire de chauffer aussi fortement qu'au début; on peut baisser le feu ou porter le matras sur une partie moins chaude du bain de sable. On arrête l'attaque au bout de quelques minutes, lorsque le charbon obtenu se présente en grande partie sous forme de grumeaux, baignant dans l'acide, plus ou moins gros suivant la quantité produite; on laisse ensuite refroidir.

La bonne formation de grumeaux est essentielle pour la réussite du dosage.

Dans le matras refroidi, on introduit 5 cm3 d'acide chlorhydrique dilué de moitié, et l'on chauffe de nouveau au bain de sable, jusqu'à réapparition des vapeurs blanches acides. Les grumeaux se séparent mieux de l'acide qui devient à peu près incolore. Il n'y a plus qu'à peser le charbon formé.

Les grumeaux de charbon sont lavés dans le matras lui-même à l'eau distillée bouillante. On décante sur un filtre. Après deux lavages on entraîne tout le charbon sur le filtre. On perce le filtre pour faire tomber le charbon dans une capsule de platine au moyen d'un jet d'eau chaude, et, après addition de quelques cm3 d'ammoniaque, on évapore l'eau au bain de sable ou à l'étuve à 110°. Le charbon reste dans la capsule en grains plus ou moins gros, durs, à cassure brillante. On doit, vers la fin, les dessécher lentement, pour éviter des projections.

Avant la pesée, le charbon sera débarrassé des gaz et des sels ammoniacaux qu'il retient, par un chauffage à une température voisine du rouge, sans l'atteindre, toutefois, pour éviter la combustion. Cette opération se fait en promenant la capsule dans la flamme d'un bec Wiesnegg avec couronne à jet vertical, jusqu'à ce que toute odeur piquante ait disparu et que le poids reste constant.

En multipliant par le coefficient 2,56 le poids de ce charbon dont on

déduit les cendres après incinération, on a le poids de glycérine correspondant.

La méthode est longue et délicate, mais elle est exacte, à quelques milligrammes près, pour des poids de glycérine variant de 0,1 à 1 gramme.

Nous avons tenu à reproduire tous ces détails pour montrer avec quelle minutie la méthode avait été conçue et décrite par son auteur.

Une telle méthode ne pouvait être utilisée constamment par nous. Nous la réservions comme méthode de contrôle et nous nous contentions, en général, d'une méthode beaucoup plus rapide et plus simple, celle de Nicloux, par le bichromate de potassium en solution sulfurique.

Méthode de Nicloux, dite *méthode chromométrique* (12). — En présence de l'acide sulfurique, une molécule de bichromate de potassium cède 3 atomes d'oxygène, d'après l'équation suivante :

(1) $Cr^2O^7K^2 + 4\ SO^4H^2 = (SO^4)^3Cr^2 + SO^4K^2 + 4\ H^2O + 3\ O$

Un grand nombre de matières organiques, surtout en milieu fortement sulfurique, sont susceptibles d'être oxydées par l'acide chromique libre ou combiné. Nicloux a particulièrement étudié, à ce point de vue, plusieurs corps, dont le glycérol, et a montré qu'avec ce produit, en se plaçant dans des conditions bien déterminées, on pouvait effectuer des opérations quantitatives rigoureuses.

La liqueur titrée employée par l'auteur est une solution de dichromate de potassium pur à 19 grammes par litre. La teneur des solutions à doser ne doit pas dépasser 2 grammes de glycérol par litre.

Le mode opératoire est le suivant :

Dans trois tubes à essais de 16 à 18 cm. de hauteur sur 16 à 18 mm. de diamètre intérieur, bien propres, et surtout exempts de poussières, on introduit 5 cc. de la solution glycérique à titrer, et 5 cc. d'acide sulfurique pur; on agite et on chauffe, jusqu'à légère ébullition, le contenu du premier tube.

Cela fait, on retire du feu, et, agitant après chaque addition, on verse dans le tube chauffé 1, 2 ...n dixièmes de centi-cube de la liqueur titrée de dichromate jusqu'à ce que le mélange, d'abord franchement vert (par la présence exclusive de sulfate de chrome comme matière colorante), prenne une teinte virant peu à peu vers le jaune.

On note le nombre de dixièmes de centi-cubes employés, soit 12 dixièmes.

Dans le second tube chauffé comme le précédent, on verse, en agitant, un volume de liqueur titrée de dichromate, inférieur de 2 à 3 dixièmes de centi-cube au précédent, de façon à rester à une teinte franchement verte : soit 0,9 centi-cube dans l'exemple choisi.

Dans le troisième tube enfin, chauffé comme les précédents, on verse,

en agitant, d'abord le même volume de solution de dichromate que dans le deuxième, soit 0,9 cc.; puis, goutte à goutte, et en agitant chaque fois, on continue l'addition de la liqueur titrée jusqu'à début de dégradation de la teinte vers le jaune-vert, ce qui se voit très bien par comparaison avec les deux repères précédents.

Soit 1,1 cc. ainsi employé; chaque centi-cube de liqueur de dichromate représentant un gramme de glycérol par litre de liquide essayé, ce liquide renfermerait, dans l'exemple choisi, 1,1 gramme de glycérol par litre.

Les chiffres donnés ci-dessus ne nous paraissant pas conformes à la réalité, nous sommes reparti des chiffres théoriques.

L'équation suivante représente la réaction d'oxydation du glycérol par le dichromate de potassium en solution sulfurique :

$$(2)\quad CH^2OH — CH\,OH — CH^2OH + 7\,O = 4\,H^2O + 3\,CO^2.$$

En rapprochant cette équation de l'équation (1), nous voyons qu'il est nécessaire de prendre $\frac{7}{3}$ de molécule de dichromate de K, $Cr^2O^7K^2$, pour obtenir les 7 atomes d'oxygène nécessaire à l'oxydation d'une molécule de glycérol.

Ces $\frac{7}{3}$ de molécule sont représentés par $294 \times \frac{7}{3} = 686$.

La molécule-gramme de glycérol étant de 92, la quantité de dichromate nécessaire pour oxyder 1 gramme de glycérol pur sera égale à $\frac{686}{92} = 7{,}456$ grammes.

En réalité, notre glycérol n'est pas pur; il contient, nous l'avons dit, 4 p. 100 d'eau et peut-être d'autres impuretés et n'exige pas, pour son oxydation, une telle quantité d'oxygène.

1 gramme est pratiquement oxydé par 7,158 gr. de dichromate de potassium.

Pour effectuer le dosage dans les meilleures conditions de concentration, c'est-à-dire pour faire l'oxydation sur une quantité de glycérol inférieure à 2 grammes par litre, comme cela a été recommandé, nous diluions chaque fois notre milieu de Sauton au quarantième $\left(\frac{1}{40}\right)$, ce qui correspondait, pour un Sauton neuf, à 1,50 gramme de glycérol pour 1 litre. C'est sur 5 cm3 de cette dilution que nous faisions le titrage par la solution titrée de bichromate.

D'après nos calculs, les 5 cm3 de dilution à 1/40 devaient exiger, pour s'oxyder, 2,80 cm3 de solution de bichromate. C'est le

chiffre que nous trouvions avec une solution aqueuse de notre glycérine, préparée extemporanément à 1,5 p. 1.000.

Nos dosages sur milieu de Sauton neuf nous donnaient généralement 2,75 cm3. Nous avons pris pour base 2,75.

Pour connaître la teneur d'un milieu en glycérol, nous n'avions qu'à opérer, toujours dans les mêmes conditions, sur 5 cm3 d'une dilution à $\frac{1}{40}$ du milieu en question et de faire une simple proportion, par exemple :

$$60 \text{ (glycérol)} \times \frac{1,8}{2,8} = 38,57 \text{ grammes au litre.}$$

Tous nos dosages de glycérol ont été pratiqués de cette façon.

Le glycérol n'est pas seul dans le milieu de Sauton à être oxydé par le bichromate en solution sulfurique.

L'acide citrique, qui possède une fonction alcool est également oxydé dans les mêmes conditions. Quelle peut être la part de l'acide citrique dans la quantité de bichromate qui a servi à oxyder l'ensemble ? C'est ce que nous allons déterminer.

Ce qui se passe, ici, doit être analogue à ce que nous obtenions précédemment dans la formation d'acide acétone-dicarbonique sous l'effet du permanganate acide : un seul atome d'oxygène suffirait à oxyder une molécule d'acide citrique.

Si nous nous livrons à des calculs analogues à ceux que nous avons faits pour l'oxydation du glycérol, nous arrivons à cette conclusion que les 2 grammes d'acide citrique, qui accompagnent les 60 grammes de glycérol, n'exigent, pour leur oxydation, que 0,933 gramme de dichromate de K.

Dans les conditions où nous opérons, après dilution au $\frac{1}{40}$, la part de solution titrée de dichromate qui revient à l'acide citrique se traduit par 0,006 centi-cube, ce qui est parfaitement insignifiant par rapport aux 2,75 cm3 versés pour le glycérol.

En admettant même que, sous l'action du dichromate et de l'acide sulfurique, la molécule d'acide citrique soit entièrement détruite, son oxydation nécessiterait alors 9 atomes d'oxygène. Tout calcul fait, le volume de solution titrée de dichromate nécessaire atteindrait, dans notre dosage, 0,054 cm3, soit un demi-dixième de centi-cube, en chiffre rond.

L'erreur qui en résulterait serait de 2 p. 100 seulement. Nous ne

tiendrons donc aucun compte de l'oxydation de l'acide citrique et considèrerons que les chiffres de solution de dichromate trouvés dans nos essais intéressent uniquement le glycérol.

Comme pour les éléments précédemment étudiés, nous avons rapporté tous nos résultats au litre de milieu de Sauton, pris à son état initial, c'est-à-dire en tenant compte de la concentration du milieu par perte d'eau à l'étuve.

Nous avons groupé dans un tableau tous les chiffres représentant les concentrations de nos milieux en glycérol, d'après l'âge des cultures. Au-dessous de ces chiffres, figurent, entre parenthèses, les pourcentages correspondants de glycérol disparu sous l'influence de la vie microbienne.

Ici nous n'avons plus à constater le passage par un minimum, à un moment donné. Le glycérol disparu a été détruit. Il ne peut donc plus être restitué au milieu par la lyse des microbes morts.

Les quantités de glycérol demeurant dans le milieu décroissent donc régulièrement jusqu'à la fin de l'évolution du voile, tandis que les pourcentages de consommation croissent avec la même régularité.

Remarque I. — Les bacilles ne consomment par tous également le glycérol. Ainsi que nous l'observerons plus loin, au sujet du sulfate de magnésium, les bacilles B et A seraient les plus forts consommateurs.

Alors que le B.C.G. et le H. n'utiliseraient pas 70 p. 100 du glycérol mis à leur disposition, les bacilles B. et A. utiliseraient pratiquement la totalité (99,5 %).

Le bacille A., toujours en retard sur les autres, précipite sa consommation de glycérol à partir du 42e jour.

Les faits que nous venons de signaler sont mis en relief sur les courbes comparées de consommation. Fig. 8.

Remarque II. — Le B.C.G. et le B. présentent leur plus forte consommation à la fin de la 6e semaine, tandis que le H. et le Av. ne la présentent qu'après 9 semaines, ce qui est en parfait accord avec les remarques faites précédemment au sujet des masses microbiennes et du pH des différents milieux.

Essai d'interprétation des résultats trouvés. — Le glycérol étant le plus important des éléments constitutifs du milieu de Sauton, il est juste que nous fixions un peu notre attention sur lui, pour savoir ce qu'il devient.

60 grammes de glycérol, au départ, disparaissent à peu près totalement au cours de l'évolution microbienne, du moins en ce qui concerne les bacilles B. et A.

Tableau VI. — **Concentrations et pourcentages de Consommation en Glycérol.**

Milieux cultivés en	0	7	14	21	28	35	42	∞	56	63
B.C.G	60	53 (11,7 %)	52 (13,4 %)	41,9 (30,2 %)	41 (31,7 %)	30,7 (48,8 %)	22,5 (62,5 %)			
H.	60	»	45 (25 %)	40,5 (33 %)	38,4 36 %	35,7 (40,5 %)	32,5 (46 %)	28,8 (52 %)	20,5 (66 %)	19,5 (67,5 %)
B_1	45	»	32,8 (27,2 %)	24,7 (45,2 %)	10,9 (75,8 %)	0,39 (99,1 %)	0,19 (99,6 %)	0,19 (99,6 %)	0.19 (99.6 %)	
B_2	60	56 (6,7 %)	52,5 (12,5 %)	39,8 (33,7 %)	27 (55 %)	15,9 (73,5 %)	0,48 (99,2 %)	0.19 (99.7 %)	0.28 (99,5 %)	0.19 (99,7 %)
A	60	»	54,5 (9,2 %)	50,8 (15,4 %)	47 (21,7 %)	48,2 (19,7 %)	31,5 (47,5 %)	31,2 (48 %)	0.37 (99.4 %)	0.27 (99,5 %)

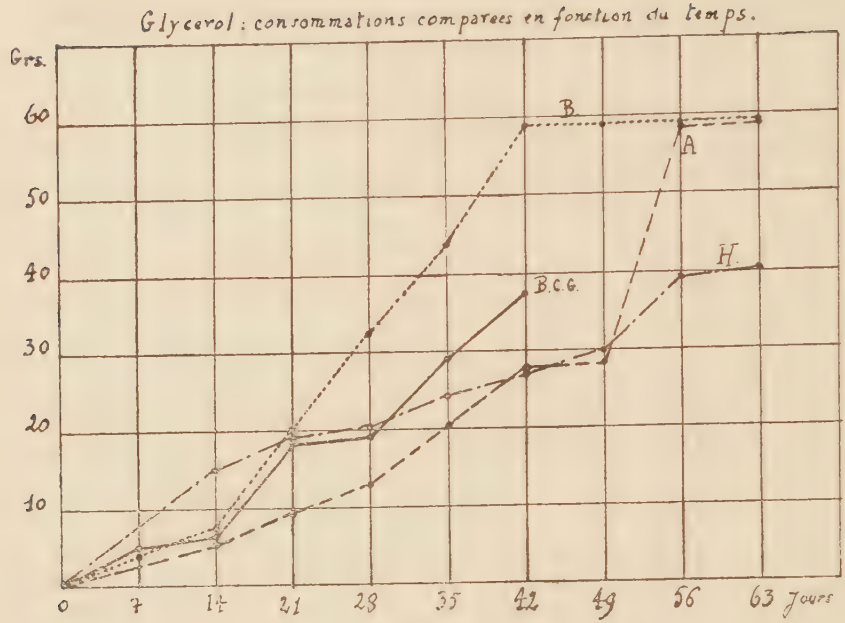


Fig 8

Lobstein (14) nous a appris que le coefficient d'utilisation, exprimant le rendement matériel, c'est-à-dire le rapport entre le poids de carbone bacillaire formé et le poids de carbone consommé, est de 0,47 pour le glycérol.

Environ la moitié du carbone du glycérol serait donc employée à la construction de la matière vivante microbienne, l'autre moitié étant brûlée et transformée en acide carbonique.

Nous avons essayé de mettre côte à côte, dans un nouveau tableau, les quantités de carbone des bacilles formés et les quantités de carbone du glycérol disparu, pour tous les milieux examinés. En regard de ces chiffres, nous avons placé, entre parenthèses, les chiffres représentant les coefficients d'utilisation pour chacun d'eux.

Il est bien entendu que les coefficients ainsi donnés n'ont pas une valeur absolue. Il eût fallu, comme le dit lui-même Lobstein (13), effectuer les dosages de carbone organique par combustion, sur les microbes secs, sur les milieux correspondants et sur un milieu neuf pris comme témoin. Car le glycérol n'est pas seul, dans le milieu, à fournir du carbone. L'asparagine en fournit un

Tableau VII. — **Carbone bacillaire formé et Carbone du Glycérol disparu, en fonction du temps.**

(Coefficients d'utilisation correspondants)

	Temps en jours	7	14	21	28	35	42	49	56	63
B.C.G.	C. bacillaire formé	»	2,6	5	5,25	6,8	6,95			
	Coefficients	»	(0,83)	(0,71)	(0,71)	(0,57)	(0,473)			
	C. glycérol disparu	»	3,13	7,08	7,43	11,46	14,67			
H.	C. bacillaire formé	»	0,41	2,59	4,59	5,30	5,90	6,25	6,1	6,41
	Coefficients	»	(0,21)	(0,336)	(0,543)	(0,546)	(0,548)	(0,512)	(0,594)	(0,404)
	C. glycérol disparu	»	1,95	7,70	8,45	9,51	10,76	12,20	15,45	15,84
B_1	C. bacillaire formé	»	1,06	3,25	4,65	4,89	4,95	4,58	4,46	»
	Coefficients	»	(0,222)	(0,409)	(0,340)	(0,280)	(0,282)	(0,261)	(0,254)	
	C. glycérol disparu	»	4,77	7,94	13,64	17,45	17,53	17,53	17,53	»
B_2	C. bacillaire formé	0,13	1,08	1,54	6,41	6,93	7,51	6,91	6,58	6,51
	Coefficients	(0,083)	(0,368)	(0,574)	(0,496)	(0,401)	(0,322	(0,295)	(0,281)	(0,278)
	C. glycérol disparu	1,53	2,93	7,90	12,91	17,25	23,29	23,49	23,36	23,40
A.	C. bacillaire formé	»	0,37	1,23	3,40	2,11	5,09	5,46	7,50	8,16
	Coefficients	»	(0,172)	(0,341)	(0,669)	(0,457)	(0,456)	(0,484)	(0,321)	(0,348)
	C. glycérol disparu	»	2,15	3,60	5,08	4,61	11,15	11,27	23,33	23,37

peu, l'acide citrique également. Et puis la richesse du bacille tuberculeux en carbone peut varier légèrement. Grâce à la combustion, nous aurions de façon précise la répartition du carbone disparu. Nous n'en demandons pas tant, nous voulons simplement savoir ce que devient le glycérol au cours du développement microbien. Pour cela le dosage que nous avons adopté est amplement satisfaisant, puisqu'il nous permet de connaître à 2 % près les poids de glycérol demeurés intacts dans nos milieux de culture. De plus, nous admettons que la substance microbienne contient 50 % de son poids de carbone, ce qui n'est qu'un chiffre moyen.

Nous arriverons néanmoins à nous faire une idée des variations du coefficient d'utilisation et à en dégager quelques déductions intéressantes.

Les chiffres que nous avons sous les yeux nous suggèrent quelques remarques.

Remarque I. — Le coefficient d'utilisation semble varier beaucoup au cours de l'évolution microbienne Nous ne pensons pas qu'on puisse lui assigner une valeur, même approchée.

Si l'on considère tout l'ensemble du tableau, il apparaît que le coefficient, faible au début de la culture, augmente rapidement avec la croissance du voile, atteint son maximum au moment où ce voile contient le plus de microbes vivants (14e jour pour le B.C.G., 21e jour pour le B. et 28e jour pour le H. et le Av.), puis diminue pour retomber à une valeur variable, suivant le bacille considéré. Fig. 9.

C'est pour le B.C.G. que le coefficient atteint le chiffre le plus fort (0,83) et reste le plus élevé jusqu'à la fin de l'évolution du voile.

Le chiffre le plus faible, en fin d'évolution, est donné par le bacille B.

Remarque II. — Devons-nous en conclure que le B.C.G. utilise mieux que les autres bacilles le carbone du glycérol ? S'il en est ainsi, la quantité d'acide carbonique produite au cours de l'évolution doit être plus considérable avec les autres bacilles qu'avec le B.C.G. Nous pouvons répondre à cette question en ce qui concerne le bacille H., puisque B.C.G. et H. ont été étudiés en atmosphère fermée.

Si nous nous reportons à l'étude des échanges gazeux, nous constatons que :

1° Pour la formation de 10,966 grammes de bacilles H., nous avons eu un départ de 25,272 grammes d'anhydride carbonique;

2° Pour la formation de 10,530 grammes de bacilles B.C.G., nous n'avons eu qu'un dégagement de 10 grammes d'anhydride carbonique.

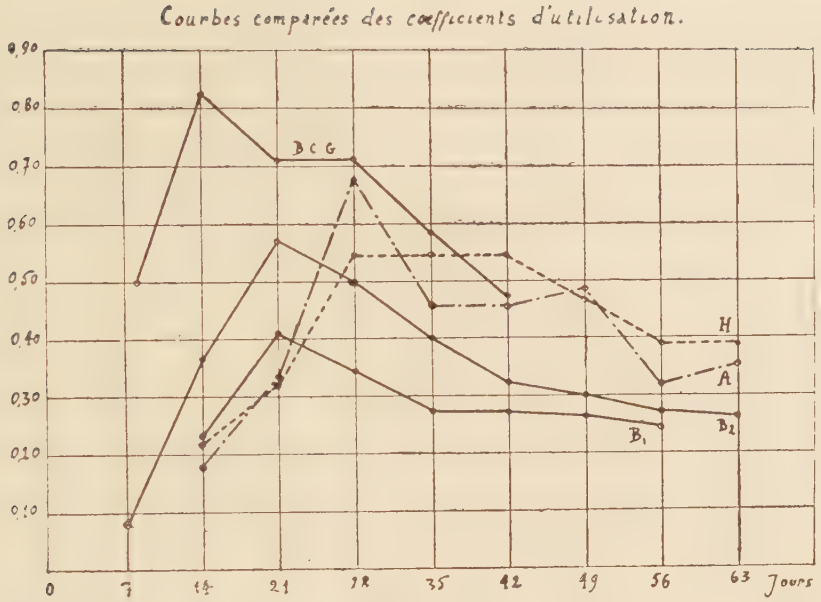


Fig. 9

En d'autres termes, le bacille B.C.G. a besoin, pour son développement, de moins d'énergie que les autres bacilles tuberculeux, et brûle, moins que ceux-ci, l'élément hydrocarboné mis à sa disposition.

Remarque III. — Revenons à notre expérience en appareil fermé.

Pour la formation de 10,966 grammes de bacilles H., il y a eu utilisation de 35,4 grammes de glycérol.

Or, 35,4 grammes de glycérol renferment 13,850 grammes de carbone, et 10,966 grammes de microbes représentent 5,498 grammes de carbone. Par différence, nous trouvons un poids de 8,352 grammes de carbone, qui ont servi d'aliment énergétique.

Si nous retirons de ces 8,352 grammes de carbone celui qui a servi à former les 25,272 grammes d'anhydride carbonique mesurés, c'est-à-dire 6,892 grammes, il nous reste encore 1,460 gramme de carbone, qui vraisemblablement, serait utilisé par fixation au sein du milieu lui-même, sous forme de produits d'oxydation intermédiaires (acide oxalique ou autres).

A lui seul, le glycérol disparu suffit à expliquer les échanges que nous avons pu mesurer en appareil fermé. A côté du glycérol se trouvent deux éléments du milieu de Sauton qui fournissent aussi un peu de carbone par leur désagrégation, l'asparagine et l'acide citrique. Ce carbone vient s'ajouter, en principe, à celui qui acidifie le milieu.

Remarque IV. — Si nous examinons nos résultats au point énergétique, nous arrivons à une conclusion analogue.

Les 35,4 grammes de glycérol, correspondant à 34 grammes de gly-

cérol pur, soit un tiers environ de molécule, libèrent, lors de leur destruction :

$$\frac{400}{3} = 130 \text{ grandes calories.}$$

D'autre part, les 10,966 grammes de microbes, composés environ de 5,5 grammes de matières protéiques et de 5 grammes de matières grasses, exigent, pour leur formation :

$$5{,}5 \times 4 \text{ gr. calories} = 22 \text{ gr. calories}$$
$$+ \ 5 \times 9 \text{ gr. calories} = 45 \text{ gr. calories}$$

soit, au total, 67 grandes calories utilisées pour la construction de la substance microbienne.

Sur les 130 grandes calories apportées par le glycérol, il reste une marge de 63 grandes calories, bien supérieure à la marge de 50 grandes calories que trouvait J. Debiesse pour le B.C.G.

Nous pouvons donc dire que le bacille H. exige, pour sa formation, plus d'énergie que le B.C.G.; cette énergie pourrait être retrouvée, soit sous forme calorifique, soit sous forme de travail chimique au sein du milieu de Sauton.

Devons-nous établir une liaison entre l'économie de calories faite par le B.C.G. et son état de bacille atténué ?

CHAPITRE TROISIÈME

Étude chimique quantitative des éléments azotés

(Consommation de l'asparagine et de l'ammoniac)

Asparagine

L'asparagine a pour formule brute : $C^4H^8N^2O^3 + H^2O$; et pour poids moléculaire 150. Sa formule développée s'écrit ainsi :

$$COOH — CHNH^2 — CH^2 — CONH^2 + H^2O.$$

Elle possède, sur quatre carbones, trois fonctions absolument différentes :

amine, amide et acide, et contient 18,66 p. 100 d'azote.

L'asparagine entre dans le milieu de Sauton à raison de 4 grammes par litre.

Ici, nous ne pouvions pas songer à doser directement l'asparagine sur les milieux examinés, pour la bonne raison qu'il n'existe pas de procédé qui le permette. Nous avons dû employer des moyens détournés et assez compliqués d'ailleurs.

Il s'agissait, pour nous, de faire la part entre l'azote ammoniacal qui se trouve normalement dans le milieu, l'azote amidé appartenant toujours à de l'asparagine et l'azote aminé, appartenant aussi à l'asparagine, mais pouvant, après une première atteinte à la molécule d'asparagine par hydrolyse, appartenir à une molécule plus simple comme l'acide aspartique.

En fait, c'est par la quantité d'azote amidé que nous pouvons connaître la quantité d'asparagine.

Pour doser l'asparagine dans une solution aqueuse, il suffisait de pratiquer sur cette solution une hydrolyse au moyen de l'acide chlorhydrique, et de titrer par distillation, en présence d'un excès d'alcali, l'azote ammoniacal de l'aspartate d'ammonium formé.

$$\underset{\text{(asparagine)}}{COOH — CHNH^2 — CH^2 — CONH^2} + H^2O = \underset{\text{(aspartate d'NH}^4\text{)}}{COOH — CHNH^2 — CH^2 — COONH^4}$$

Par un simple calcul on connaissait le poids d'asparagine correspondante.

Dans un milieu de Sauton vierge, non autoclavé, le dosage de l'asparagine était déjà plus compliqué. Nous nous trouvions en présence d'azote ammoniacal appartenant en propre au milieu, d'azote amidé et d'azote aminé de l'asparagine, ces deux derniers en quantités égales. Il fallait éliminer l'azote ammoniacal par évaporation dans le vide en présence de chaux, hydrolyser le résidu par l'acide chlorhydrique, et titrer, par distillation dans l'appareil d'Aubin, l'azote ammoniacal formé, correspondant à l'azote amidé. Le chiffre de ce dernier servait à calculer le taux de l'asparagine.

Dans le cas d'un milieu autoclavé, non ensemencé, un commencement d'hydrolyse s'étant produit pendant la stérilisation, une petite partie de l'azote amidé était déjà transformée en azote ammoniacal. Nous ne pouvions retrouver par hydrolyse, après élimination de l'azote ammoniacal par la chaux, que la partie intacte de l'asparagine. Par contre, l'azote aminé, demeuré intact, pouvait nous renseigner, mais nous devions recourir aux trois opérations suivantes :

1° Kjeldahl sur le milieu (filtré si besoin est), qui donne l'azote total, c'est-à-dire : l'azote ammoniacal, l'azote amidé et l'azote aminé (1);

2° Hydrolyse du milieu, suivie de distillation à l'appareil d'Aubin, qui donne : l'azote ammoniacal proprement dit et l'azote ammoniacal provenant de la fonction amide hydrolysée (2);

3° Elimination de l'azote ammoniacal du milieu par la chaux dans le vide, puis hydrolyse suivie de distillation à l'appareil d'Aubin qui donne : l'azote ammoniacal provenant de la fonction amide seulement (3).

Par différence entre les résultats (2) et (3), on connaissait l'azote ammoniacal du milieu, appelons-le N_1;

Par différence entre les résultats (1) et (2), on avait l'azote aminé, N_2; enfin le résultat (3) donnait directement l'azote amidé, N_3.

Cet azote amidé nous permettait de calculer la quantité d'asparagine correspondante (car, vraisemblablement, il ne s'était formé aucune autre amide dans le liquide).

D'autre part, l'asparagine comporte autant d'azote aminé que d'azote amidé. Si donc, en retranchant N_3 de N_2, il nous reste de l'azote aminé, celui-ci représente pour nous l'azote aminé de l'aci-

de aspartique formé dans le liquide. Il est alors possible de calculer la quantité correspondante de cet acide.

En somme, l'ensemble des trois opérations précédentes nous permettait d'obtenir, pour chacun des milieux examinés :

l' ammoniac, l'asparagine et l'acide aspartique en présence.

Tels sont les principes de la méthode employée par nous pour retrouver, dans tous nos milieux de culture, ce qui restait d'azote sous ses formes initiales, ammoniac et asparagine, ou sous une forme transitoire, l'acide aspartique.

Voici le détail des opérations effectuées :

Méthode de Kjeldahl. — Nous avons employé la méthode de Kjeldahl avec les précautions recommandées par G. Bertrand (14) pour en obtenir le maximum de précision.

20 centi-cubes de milieu de Sauton, ou 0,5 gramme de microbes secs, suivant le cas, étaient placés dans un ballon à long col (ballon à Kjeldahl de 1.000 cm3), et additionnés de :

0,5 gramme de sulfate de cuivre cristallisé,
+ 10 grammes de sulfate de potassium pur,
+ 20 centi-cubes d'acide sulfurique pur.

Le ballon était chauffé à l'aide d'un brûleur Bunsen, sur une toile métallique un peu excavée, pouvant en épouser le fond. Pour éviter toute surchauffe de liquide, une toile d'amiante était interposée, laissant au-dessus de la flamme un orifice circulaire de 3 centimètres de diamètre.

Il y avait d'abord évaporation d'eau, noircissement de la masse et mousse assez abondante. Puis la mousse s'affaissait. Quand l'évaporation de l'eau était terminée, apparaissaient des fumées blanches acides. Lorsque celles-ci avaient envahi tout le ballon, y compris le col, un petit entonnoir en verre, à douille taillée en biseau, était placé sur l'ouverture, pour condenser les vapeurs sulfuriques et les faire retomber dans le ballon.

On réglait le feu de façon à maintenir une ébullition tranquille en évitant un départ abondant de vapeurs blanches, et l'on abandonnait ainsi jusqu'à décoloration complète, en tournant de temps en temps le ballon pour nettoyer les parties noires adhérentes à la paroi. La décoloration demandait généralement 5 à 6 heures. On chauffait encore une heure après la décoloration, pour être sûr que tout l'azote était transformé en azote ammoniacal. Le liquide devait être alors limpide et de couleur vert clair (sel de cuivre). On éteignait le feu et on laissait refroidir.

Dans le ballon même on ajoutait au Kjeldahl refroidi 200 centi-cubes d'eau distillée, quelques grains de pierre ponce et environ 50 centi-cubes de lessive de soude à 36° B. pour neutraliser, puis quelques gouttes de solution de phtaléine à 1 p. 100 qui donnaient une coloration violette (rouge de la phtaléine allié au bleu du sel de cuivre); enfin 10 centi-cubes de lessive de soude pour rendre le mélange franchement alcalin.

Le ballon était immédiatement attelé à l'appareil d'Aubin. On avait

préparé dans un vase conique 20 cm3 d'eau distillée, avec quelques gouttes de solution de rouge de méthyle à 0,02 p. 100 d'alcool à 50° qui devait la colorer en jaune, puis une goutte d'acide sulfurique décinormal qui devait la faire virer au rouge franc.

La burette contenant l'acide décinormal était placée juste au-dessus du vase où l'on recueillait l'ammoniac, de sorte qu'on pouvait, à tout instant, verser dans celui-ci de la solution acide. Un tube à boule, effilé à son extrémité inférieure, faisait suite au réfrigérant et plongeait dans l'eau du vase récepteur, en sorte qu'aucune perte de vapeur ammoniacale ne pouvait se produire.

On chauffait le ballon et on réglait la flamme pour avoir une ébullition tumultueuse, mais régulière. Quand le distillat commençait à passsr, il faisait virer immédiatement le liquide récepteur au jaune. On versait alors, au fur et à mesure de l'arrivée de l'ammoniac, des quantités de liqueur acide qui le saturaient; ces quantités devenaient de plus en plus faibles; à la fin on ne versait plus qu'une goutte à la fois, et lorsque la teinte rouge persistait quelques minutes sans changement, on pouvait considérer l'opération comme terminée. Il n'y avait plus qu'à noter le nombre n de centi-cubes d'acide décinormal versés :

$$1 \text{ cc. } SO^4H^2 \frac{N}{10} = 0{,}0014 \text{ d'azote.}$$

En ce qui nous concerne, si nous dosions l'azote d'un milieu (nous étions parti de 20 centi-cubes), le résultat était :

$$n \times 0{,}0014 \times 50, \text{ pour un litre.}$$

Si nous cherchions le taux d'azote des microbes secs (en partant de 0,5 gramme),

$$n \times 0{,}0014 \times 200, \text{ pour 100 grammes de microbes secs.}$$

Par ce dosage, nous obtenions la totalité de l'azote contenu dans le milieu, sous ses trois formes : ammoniacal, amidé ou aminé.

Au début, nous n'utilisions pas la méthode de Kjeldahl en son entier. Nous pratiquions la destruction de la matière organique, mais, au lieu de doser l'azote ammoniacal formé par distillation, nous le dosions par l'hypobromite de soude, dans un uréomètre à urine.

Nous avons vite constaté que nos résultats étaient souvent trop élevés, et généralement assez irréguliers.

Nous avons ensuite essayé d'adopter le dosage par le formol, procédé rapide et si commode, quand on dose l'ammoniac dans les urines. Malheureusement, le procédé ne convient pas, nous ne retrouvions pas notre compte d'asparagine.

C'est alors que nous nous sommes décidé à ne plus employer que la distillation, exécutée suivant les indications de G. Bertrand.

Avant d'appliquer le Kjeldahl à nos milieux ensemencés, nous avons tenu à en faire l'épreuve par les essais suivants :

A. — Un Kjeldahl, pratiqué sur 30 cc. d'eau distillée tenant en dissolution 0,146 gramme de chlorhydrate d'ammoniaque desséché (0,0382 d'N) nous a donné comme résultat final 0,0381 d'azote.

B. — Un Kjeldahl, pratiqué sur 30 cc. d'eau distillée tenant en dissolution 0,142 gramme d'oxalate d'ammoniaque desséché (0,0280 d'N), nous a donné 0,0281 d'azote.

C. — Un Kjeldahl, pratiqué sur 30 cc. d'un Sauton vierge récemment préparé, nous a donné 29,15 cc. d'acide décinormal, soit 0,0408 d'azote.

D. — Un Kjeldahl, pratiqué sur 30 cc. du même milieu, additionnés de 0,170 gramme de chlorhydrate d'ammoniaque sec (0,0445 d'N), nous a donné 0,0852 d'azote (0,0408 + 0,0444).

E. — Un Kjeldahl, pratiqué sur 30 cc. du même milieu, additionnés de 0,142 gramme d'oxalate d'ammoniaque sec (0,0280 d'N), nous a donné 0,06887 d'azote (0,0408 + 0,02807).

F. — Un Kjeldahl, pratiqué sur 30 cc. du même milieu, additionnés de 0,132 gramme d'asparagine (0,0246 d'N), nous a donné 0,06524 d'azote (0,0408 + 0,02444).

Tous ces résultats étaient encourageants; nous pouvions, en toute confiance, employer le Kjeldahl ainsi conçu.

Maquenne A. — Notre seconde opération, hydrolyse du milieu de Sauton, repose sur ce fait, signalé par Maquenne (15), que l'asparagine, en solution acide, à l'ébullition, se transforme, par hydrolyse, en aspartate d'ammonium. Cet aspartate d'ammonium, en solution alcaline, à l'ébullition, perd son ammoniac que l'on peut recueillir et doser.

Dans un ballon de 300 à 500 cm3 de capacité, nous mettions 40 centicubes de milieu de Sauton, que nous additionnions de 3 cm3 d'acide chlorhydrique pur et d'un grain de pierre ponce. Le ballon était mis sur la flamme d'un Bunsen et muni d'un réfrigérant à reflux. Nous chauffions le liquide en réglant la flamme de façon à obtenir une ébullition tranquille, que nous maintenions une demi-heure au minimum. Après quoi nous éteignions et laissions refroidir.

Nous nous assurions que le liquide refroidi n'avait pas perdu de son volume (43 centi-cubes) et en mesurions la moitié exactement, soit 21,5 centi-cubes, que nous portions dans un ballon à Kjeldahl avec 150 cm3 d'eau distillée, une goutte de solution de phtaléine, quelques grains de pierre ponce, et de la lessive de soude jusqu'à franche alcalinité. Le ballon était immédiatement attelé à l'appareil d'Aubin, nous opérions la distillation et le titrage par l'acide sulfurique décinormal, exactement comme nous l'avons décrit plus haut.

Le nombre n de centi-cubes d'acide versés, multiplié par 0,0014, donnait l'azote ammoniacal de 20 centi-cubes de milieu.

$n \times 0{,}0014 \times 50$ représentait l'azote ammoniacal d'un litre de milieu.

Cet azote correspondait à l'azote ammoniacal préexistant dans le milieu et à l'azote ammoniacal résultant de l'hydrolyse de la fonction amide de l'asparagine.

Pour simplifier les dénominations, nous avons désigné cette opération sous le nom de *Maquenne A*, réservant celui de *Maquenne B* à l'opération suivante.

Maquenne B. — En effet, notre troisième opération : évaporation du milieu en présence de chaux, suivie d'hydrolyse, avait pour but d'éliminer tout l'azote ammoniacal se trouvant dans le milieu, azote préexistant et azote de l'aspartate d'ammonium formé, puis par hydrolyse du résidu, de transformer l'azote amidé restant en sel ammoniacal, pour le doser par distillation.

L'évaporation en présence de chaux demande certaines précautions. Au début, nous la faisions au bain-Marie, comme pour le dosage des acides aminés de l'urine (16), sur 44 cm3 de milieu additionnés de 40 cm3 de lait de chaux récemment préparé. Mais nous avons constaté de notables pertes d'azote; nous avons donc décidé de recourir à l'évaporation dans le vide, ou tout au moins sous pression réduite.

L'évaporation de 44 + 40 = 84 centi-cubes de liquide pouvait offrir quelques difficultés, nous avons alors remplacé les 40 cm3 de lait de chaux par quelques grammes de chaux éteinte jetés directement dans le ballon et mélangés avec les 44 cm3 de milieu de Sauton.

Le ballon était placé dans un bain d'eau à 50° C., et rejoint à une trompe à eau qui aspirait les vapeurs d'eau et d'ammoniac. Quand l'évaporation était achevée, nous versions dans le ballon 44 cm3 d'eau distillée pour remplacer celle qui était partie et mélangions bien pour redissoudre tous les principes autres que la chaux en excès; puis nous jetions sur un filtre pas trop grand, pour recueillir exactement 40 centi-cubes de liquide, qui correspondaient à 40 cm3 du milieu de Sauton.

Nous n'avions plus qu'à pratiquer sur ces 40 cm3 la deuxième opération décrite ci-dessus : addition de 3 cm3 d'acide chlorhydrique, ébullition à reflux pendant une demi-heure, puis, après refroidissement, titrage par distillation à l'appareil d'Aubin sur 21,5 centi-cubes, représentant 20 cm3 du milieu initial.

Tout l'azote ammoniacal, quelle que fût son origine, ayant été chassé par l'évaporation en présence de chaux, ce titrage nous donnait uniquement l'azote amidé de l'asparagine existant dans le milieu (N_3).

L'opération que nous venons de décrire est celle que nous avons dénommée Maquenne B.

Nous avons tenu à faire l'épreuve de ces deux opérations, Maquenne A et Maquenne B, avant de commencer toute la série de nos essais.

1° Un Maquenne A, pratiqué sur 25 centi-cubes d'une solution aqueuse d'asparagine à 4 grammes pour 1.000 (soit 0,100 gramme d'asparagine ou 0,00933 d'azote amidé) nous a donné 0,00924 d'azote

2° Un Maquenne B, pratiqué sur 25 centi-cubes d'un milieu de Sauton vierge, non étuvé (0,100 gramme d'asparagine ou 0,00933 d'azote amidé) nous a donné 0,00917 d'azote.

Considérant ces résultats comme suffisamment approchés, nous avons adopté les deux procédés.

Nous avons groupé, dans le tableau suivant, tous les résultats que nous avons enregistrés, concernant les trois opérations pratiquées sur nos milieux ensemencés. Nous les présentons par espèce microbienne.

Nous y reproduisons les chiffres donnés par J. Debiesse pour le B.C.G. Tous les chiffres inscrits représentent, en centi-cubes, les volumes d'acide sulfurique décinormal nécessaires pour saturer l'ammoniac existant ou formé dans 20 cm3 de chacun de nos divers milieux.

Nous constatons que, pour tous les bacilles, les quantités mentionnées vont en décroissant régulièrement du commencement à la fin, au fur et à mesure que l'azote est assimilé par la masse microbienne, au cours de son développement.

Remarque. — Pour les bacilles B_1 et B_2, nous voyons que du 42e au 63e jour, c'est-à-dire après la fin de leur évolution, les chiffres remontent un peu. Cela est toujours dû à la lyse des microbes morts qui laissent filtrer une partie de leur substance azotée dans le milieu. Toutefois, il est un chiffre qui ne remonte pas, c'est celui de l'azote amidé; cela se conçoit, il ne peut pas se reformer d'asparagine.

Remarque. — L'écart entre les résultats (1) et (2) qui, au départ, représente l'azote aminé, diminue au fur et à mesure de l'évolution, mais, vers la fin, il ne représente plus l'azote aminé seul, la petite quantité d'azote protéique, formé ou filtré dans le milieu, se trouvant dosée en même temps.

Nous allons traduire en grammes d'azote par litre de milieu de Sauton, les résultats donnés ci-dessus. Nous le ferons en tenant compte de la concentration des milieux par perte d'eau à partir de leur mise en ballons, tant à l'autoclave qu'à l'étuve à 38° C.

Tableau VIII. — **Volumes, en centi-cubes, d'acide sulfurique décinormal pour saturer NH^3 de 20 cm^3 de milieu.**

Temps en jours		0 avant autoclave	7	14	21	28	35	42	49	56	63
B.C.G.	Kjeldahl (1)	19,54	17,50	14,29	9,65	4,65	4,30	4,10	»	»	»
	Maquenne A. (2)	13,95	12,20	12	8,20	3,80	3,35	3,20	»	»	»
	Maquenne B. (3)	5,38	3,04	1,12	0,48	0,40	0,30	0,28	»	»	»
H.	Kjeldahl (1)	19,27	»	18,2	13,1	8,1	6,7	5,3	4,55	5,2	4,6
	Maquenne A. (2)	13,88	»	14,4	11,32	7,12	5,6	4,08	3,12	3,3	2,35
	Maquenne B. (3)	5,38	»	3,68	0,32	0,08	0,24	0,16	0,16	0,15	0,3
B_1	Kjeldahl (1)	13,94	14,1	17,5	6,05	3,6	2,9	2,9	3,25	3,6	»
	Maquenne A. (2)	9,90	10,4	10,9	5,65	2,65	2,15	1,8	2,25	2,3	»
	Maquenne B. (3)	4,04	3,75	0,65	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,25	»
B_2	Kjeldahl (1)	19,12	19	16,9	9,1	6,05	5,2	4,1	4,55	5,05	5,5
	Maquenne A. (2)	13,74	14	14,45	7,85	5	4	3,07	3,3	3,65	3,6
	Maquenne B. (3)	5,38	4,8	2,2	0,65	0,4	0,45	0,3	0,3	0,3	»
A.	Kjeldahl (1)	21,17	»	21	19,6	14,35	18,2	11,55	11,9	5,1	4,2
	Maquenne A. (2)	15,78	»	16	15	10,85	14,05	8,65	8,37	3,05	1,85
	Maquenne B. (3)	5,38	»	5,1	4,1	2,45	1,15	0,70	0,45	0,9	0,7

Tableau IX. — **Poids d'azote, en grammes par litre de milieu, après correction, en fonction du temps.**

Temps en jours		0 avant autoclave	7	14	21	28	35	42	49	56	63
		sans correction									
B.C.G	Kjeldahl (1)	1,354	1,221	0,997	0,657	0,319	0,292	0,275	»	»	»
	Maquenne A. (2)	0,977	0,852	0,836	0,560	0,241	0,228	0,213	»	»	»
	Maquenne B. (3)	0,377	0,211	0,078	0,030	0,026	0,020	0,019	»	»	»
H.	Kjeldahl (1)	1,549	»	1,176	0,833	0,503	0,419	0,329	0,275	0,307	0,270
	Maquenne A. (2)	0,972	»	0,930	0,718	0,442	0,350	0,253	0,188	0,195	0,138
	Maquenne B. (3)	0,377	»	0,238	0,020	0,005	0,015	0,010	0,0097	0,0088	0,0176
B_1	Kjeldahl (1)	0,976	0,910	0,722	0,377	0,225	0,178	0,1746	0,1936	0,215	»
	Maquenne A. (2)	0,693	0,669	0,684	0,352	0,1656	0,132	0,108	0,134	0,137	»
	Maquenne B. (3)	0,283	0,241	0,041	0,0187	0,0187	0,0184	0,018	0,0179	0,015	»
B_2	Kjeldahl (1)	1,339	1,241	1,0765	0,571	0,381	0,3265	0,2497	0,273	0,3015	0,326
	Maquenne A. (2)	0,962	0,914	0,920	0,493	0,315	0,251	0,1866	0,198	0,218	0,213
	Maquenne B. (3)	0,377	0,313	0,140	0,041	0,025	0,028	0,018	0,018	0,0178	0,017
A.	Kjeldahl (1)	1,482	»	1,361	1,230	0,887	1,130	0,695	0,7276	0,297	0,243
	Maquenne A. (2)	1,105	»	1,037	0,942	0,670	0,872	0,521	0,500	0,178	0,107
	Maquenne B. (3)	0,377	»	0,3305	0,257	0,151	0,071	0,042	0,027	0,052	0,0405

En possession de tous ces chiffres (tableau IX), qui ne sont en somme que les résultats (1), (2) et (3) de nos trois opérations, traduits en grammes d'azote, nous pouvons, comme nous l'avons dit précédemment, faire une répartition de l'azote entre :

azote ammonical proprement dit, N_1;

azote amidé appartenant à l'asparagine, N_3;

azote aminé, appartenant, partie à l'asparagine, partie à l'acide aspartique formé dans le milieu, N_2.

L'azote ammoniacal N_1, est obtenu par différence entre les résultats (2) et (3), Maquenne A et Maquenne B.

L'azote amidé est donné directement par le résultat (3), Maquenne B.

L'azote aminé est donné par la différence entre les résultats (1) et (2), Kjeldahl et Maquenne A.

Dans le chiffre de l'azote aminé doit se trouver une petite quantité d'azote protéique, qui ne fait que croître avec le temps d'évolution. Nous en reparlerons un peu plus tard.

Nous présentons donc en un nouveau tableau n° X, la répartition de l'azote en fonction du temps.

Il nous est facile, à présent, de connaître, pour chaque milieu examiné, les quantités d'ammoniac, d'asparagine et d'acide aspartique en présence.

Pour l'ammoniac, il suffit de multiplier le poids d'azote trouvé par $\frac{17}{14}$, soit le coefficient 1,214;

pour l'asparagine, l'azote amidé représentant les $\frac{14}{150}$ du total, nous emploierons le coefficient $\frac{150}{14}$ ou 10,714;

enfin, pour l'acide aspartique, sachant que, dans l'asparagine, l'azote aminé et l'azote amidé figurent en quantités égales, nous soustrairons le poids d'azote amidé de celui d'azote aminé; le reste, qui, en principe, appartient à l'acide aspartique formé dans le milieu, sera multiplié par le coefficient $\frac{133}{14}$ ou 9,5.

Voici, réunis dans le tableau suivant, tableau n° XI, tous les

Dans ce tableau, il n'est pas un chiffre qui dépasse le gramme, nous croyons donc bien faire, pour simplifier, de les inscrire tous en milligrammes.

Tableau X. — **Répartition de l'azote dans les milieux, en fonction du temps.**

Temps en jours			0	7	14	21	28	35	42	49	56	∞
en milligrammes												
B.C.G.	N. ammon. (2) — (3)	N_1	600	641	758	530	215	208	194	»	»	»
	N. amidé (3)	N_3	377	211	78	30	26	20	19	»	»	
	N. aminé (1) — (2)	N_2	377	369	161	96	78	63	61	»	»	»
H.	N. ammon. (2) — (3)	N_1	595	»	692	698	437	335	243	178,7	186,2	120,4
	N. amidé (3)	N_3	377	»	238	20	5	15	10	9,7	8,8	17,6
	N. aminé (1) — (2)	N_2	377	»	246	114	61	69	76	87	112	132
B.	N. ammon. (2) — (3)	N_1	410	428	643	333	147	113,6	90	116	122	»
	N. amidé (3)	N_3	283	241	41	18,7	18,7	18,4	18	17,9	15	»
	N. aminé (1) — (2)	N_2	283	241	38	25	59,4	46	66,6	59,6	78	»
B.	N. ammon. (2) — (3)	N_1	585	601	780	452	290	223	168,6	180	200,2	196
	N. amidé (3)	N_3	377	313	140	41	25	28	18	18	17,8	17
	N. aminé (1) — (2)	N_2	377	327	156,5	78	66	75,5	73,1	75	83,5	113
A.	N. ammon. (2) — (3)	N_1	728	»	706,5	685	519	801	479	473	126	66,5
	N. amidé (3)	N_3	377	»	330,5	257	151	71	42	27	52	40,5
	N. aminé (1) — (2)	N_2	377	»	324	288	217	258	174	157,6	119	136

Tableau XI. — **Poids en grammes d'ammoniac, d'asparagine et d'acide aspartique en fonction du temps.**

Temps en jours		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
en grammes p. litre											
B.C.G.	Ammoniac	0,728	0,778	0.920	0,643	0,261	0,252	0,235	»	»	»
	Asparagine	4	2.26	0.835	0.321	0.278	0,214	0.203	»	»	»
	Acide aspartique	»	1.501	0.788	0.627	0,494	0,408	0.399	»	»	»
H.	Ammoniac	0.722	»	0.840	0,847	0.550	0.406	0.295	0.217	0.226	0,146
	Asparagine	4	»	2.55	0.214	0.053	0.161	0.107	0,104	0.094	0,188
	Acide aspartique	»	»	0.074	0.893	0.552	0.513	0.627	0,734	0.980	1,087
B_1	Ammoniac	0.510	0.519	0.780	0.404	0.178	0.138	0.109	0,140	0,148	»
	Asparagine	3	2,58	0,439	0.200	0.200	0,197	0,193	0,191	0,161	»
	Acide aspartique	»	»	»	0.060	0.387	0.262	0.461	0.396	0,598	»
B_2	Ammoniac	0.710	0.729	0,947	0.548	0.352	0,270	0.205	0.218	0.243	0,238
	Asparagine	4	3.35	1.50	0.439	0.268	0.300	0.195	0,193	0.190	0,182
	Acide aspartique	»	0.133	0.156	0.351	0.389	0.451	0.522	0,541	0.624	0,912
A.	Ammoniac	0.883	»	0.857	0,831	0.630	0.972	0,581	0.574	0.153	0,080
	Asparagine	4	»	3.54	2.75	1.62	0.760	0,450	0,289	0,557	0,433
	Acide aspartique	»	»	»	0,294	0,627	1,776	1,254	1,290	0,636	0,907

chiffres d'ammoniac, d'asparagine et d'acide aspartique, calculés comme nous venons de l'indiquer.

Nous nous réservons de faire, sur les chiffres figurant à ce tableau, un certain nombre de remarques qui ne sont pas sans intérêt.

Remarque I. — Les poids d'*ammoniac* croissent très rapidement pendant les quinze premiers jours, pour décroître ensuite régulièrement jusque vers une limite variable avec le bacille. Cette évolution correspond exactement (exception faite pour le bacille A.), à une alcalinisation du milieu, alcalinisation rendue tangible par la mesure du pH.

En effet, nous avons vu que pour trois des bacilles, le B.C.G., le B. et le H., le pH, quelle que soit sa valeur au départ, 7,2 ou 6,9, tend toujours vers un même maximum 7,5, le 14e jour, pour descendre ensuite d'une façon permanente vers un minimum voisin de 5 pour le B.C.G. et le B., voisin de 4 pour le bacille H.

Nous avons vu également que le bacille A., se distinguant des trois autres, n'alcalinise pas le milieu; que le pH de son milieu décroît, dès le début, jusqu'à la fin, pour atteindre le même minimum qu'avec le bacille H., au voisinage de 4.

Tous ces faits trouvent leur explication dans l'évolution du taux d'ammoniac. En effet, pour le B.C.G. et le B., le pH ne descend pas au-dessous de 5, et parallèlement, le taux d'ammoniac ne descend pas au-dessous de 200 milligrammes.

Pour les bacilles H. et A., le pH descend vers 4, mais le taux d'ammoniac descend franchement vers 100 milligrammes.

Le bacille B., cultivé sur Sauton ne contenant que 3 grammes d'asparagine a vu son pH descendre à 4,3 et son taux d'ammoniac vers 100 milligrammes. Mais en l'occurrence, le bacille B. ne s'est pas trouvé dans les conditions normales, sa ration alimentaire étant diminuée de 25 p. 100.

Le bacille A. n'alcalinise pas le milieu. Et pourtant son taux d'ammoniac au départ était très fort (883 milligrammes) et son pH élevé (7,25). Il était donc dans les meilleures conditions pour alcaliniser. Il ne l'a pas fait.

Nous avons eu confirmation du fait par l'ensemencement d'une deuxième série de bacille A., qui nous a donné exactement le même résultat (voir courbes superposées, fig. I).

Remarquons encore, à l'appui de ce que nous venons de dire, que le taux d'ammoniac du bacille A. ne s'est pas élevé, dans les 14 premiers jours, alors que pour les autres bacilles, il arrive à s'élever de 200 milligrammes dans le même temps.

Remarque II. — *L'asparagine* disparaît beaucoup plus lentement avec le bacille A. qu'avec les trois autres, et particulièrement avec le B.C.G. et le B. Avec ces derniers, 3/8 de l'asparagine sont hydrolysés en 14 jours; avec le bacille A., ils ne le sont qu'en 28 jours.

Ce fait est en concordance avec ce que nous signalions précédemment au sujet de l'ammoniac formé.

Par ailleurs, la consommation globale d'asparagine paraît sensiblement la même pour les quatre bacilles. Nous trouvons en effet :

95 % pour les bacilles B.C.G. et B.
97,5 % » le bacille H.
92,5 % » » A.

Remarque III. — *L'acide aspartique*, azote aminé, est utilisé au moins aussi rapidement que l'azote amidé.

Le bacille aviaire, au début, paraît avoir assimilé autant d'azote aminé que d'azote amidé. Le 7e jour, nous ne retrouvons pas d'acide aspartique; le 14e jour, très peu encore.

Nous avons fait la même constatation avec le bacille B_1; mais les conditions particulières dans lesquelles s'est développé celui-ci suffiraient à expliquer cette anomalie.

Dans l'ensemble, les premiers jours de culture, il y aurait utilisation d'une grande partie de l'azote aminé, les taux d'acide aspartique dosé sont faibles (voir bacilles H., B_2 et A.). Seul le B.C.G. semble agir différemment, et produit d'emblée une grosse quantité d'acide aspartique, qu'il assimile lentement par la suite.

Remarque IV. — A propos des chiffres d'acide aspartique, nous ferons constater qu'ils croissent toujours en fin d'évolution. Cela tient à ce que, dans l'azote que nous dosons comme aminé, et que nous calculons en acide aspartique, il y a une certaine quantité d'azote protéique, quantité d'autant plus forte que nous nous éloignons davantage du temps normal d'évolution, les microbes morts abandonnant par lyse une bonne partie de leur matière protéique.

Sandor a dosé des quantités de 0,30 gramme de matière protéique par litre de Sauton. Rien ne dit qu'on ne puisse en trouver davantage.

En effet, nous trouvons (voir tableau X) des excédents de 90 à 100 milligrammes d'azote, ce qui équivaut à 0,625 gramme de matière protéique, chiffre qui ne nous paraît pas improbable dans les cultures anciennes.

Azote total des microbes formés

Jusqu'ici, nous avons pu constater, par les dosages effectués sur les différents milieux, la disparition progressive de l'azote. Nous ne nous sommes pas encore préoccupé de ce qu'il devient. Nous allons maintenant le rechercher dans la masse microbienne, où nous le retrouverons presque en totalité.

A cette fin, nous avons dosé l'azote contenu dans les microbes secs provenant de tous les milieux examinés.

Ces dosages ont été pratiqués, comme nous l'avons dit plus haut, par la méthode de Kjeldahl, en opérant sur 0,5 gramme de microbes secs.

Voici, réunis en un tableau, les résultats que nous avons trouvés :

Tableau XII. — **Teneur des microbes secs en azote, en fonction du temps**

Temps en jours		7	14	21	28	35	42	49	56	63
Azote pour 100 gr. de microbes secs	B. C. G.	7,19	7,16	6.9	7,1	7	6,85	»	»	»
	H.	»	7,79	8.26	8,19	7,98	7,61	7,52	7,53	7,72
	B_1	»	7,81	7.63	7,14	7,05	7,11	7,25	7,32	7,49
	B_2	»	7,26	7.08	6,44	6,27	6,03	6,44	6,66	6,86
	A.	»	»	6,32	6,97	6,33	7,07	6,88	7,35	7,05

Les chiffres inscrits dans ce tableau ne présentent pas une régularité suffisante pour permettre d'en tirer une règle quelconque.

Nous constatons que, dans chaque série, les taux d'azote semblent décroître d'abord pour croître ensuite. Comme l'a interprété J. Duhesse [17], le minimum observé semble correspondre au moment où les microbes contiennent leur maximum de substance minérale, avant que celle-ci ne passe par la lyse dans le milieu environnant.

Si nous faisons une moyenne pour chaque bacille, nous trouvons :

pour le bacille B.C.G. : 7,02 grammes d'azote pour 100 grammes de microbes secs;

pour le bacille H. : 7,825 grammes d'azote pour 100 grammes de microbes secs;

pour le bacille B. : 6,63 et 7,35 grammes d'azote pour 100 grammes de microbes secs;

pour le bacille A. : 6,85 grammes d'azote pour 100 grammes de microbes secs.

Fait étrange, la série du bacille B_1 cultivé sur Sauton ne contenant que 3 grammes d'asparagine et 45 grammes de glycérol (les 3/4 de la quantité normale), nous a donné un taux de 7,35 %, alors que la série B_2, sur Sauton normal, n'a donné que 6,63 %. Nous prendrons la moyenne de ces deux chiffres, ce qui nous donnera approximativement 7.

Pour le bacille aviaire, nous considérons également le chiffre trouvé comme étant pratiquement 7.

Et alors, nous admettrons, dans l'ensemble, que le taux d'azote des bacilles tuberculeux est voisin de 7, sauf celui du bacille humain qui atteint 7,8.

La connaissance du taux d'azote des microbes secs va nous permettre de rétablir, en totalité, le bilan de l'azote de chacun de nos milieux.

En additionnant le chiffre d'azote des microbes secs avec ceux de l'asparagine, de l'acide aspartique et de l'ammoniac, nous devons retrouver, à peu de chose près, le même total pour tous les milieux d'une même série.

Nous ferons remarquer que les chiffres d'azote microbien croissent très régulièrement pendant 6 semaines pour le B.C.G. et le B., et pendant 9 semaines pour les bacilles H. et A., pour décroître ensuite, l'azote protéique des microbes morts repassant en partie dans le milieu. Cela cadre exactement avec les temps d'évolution

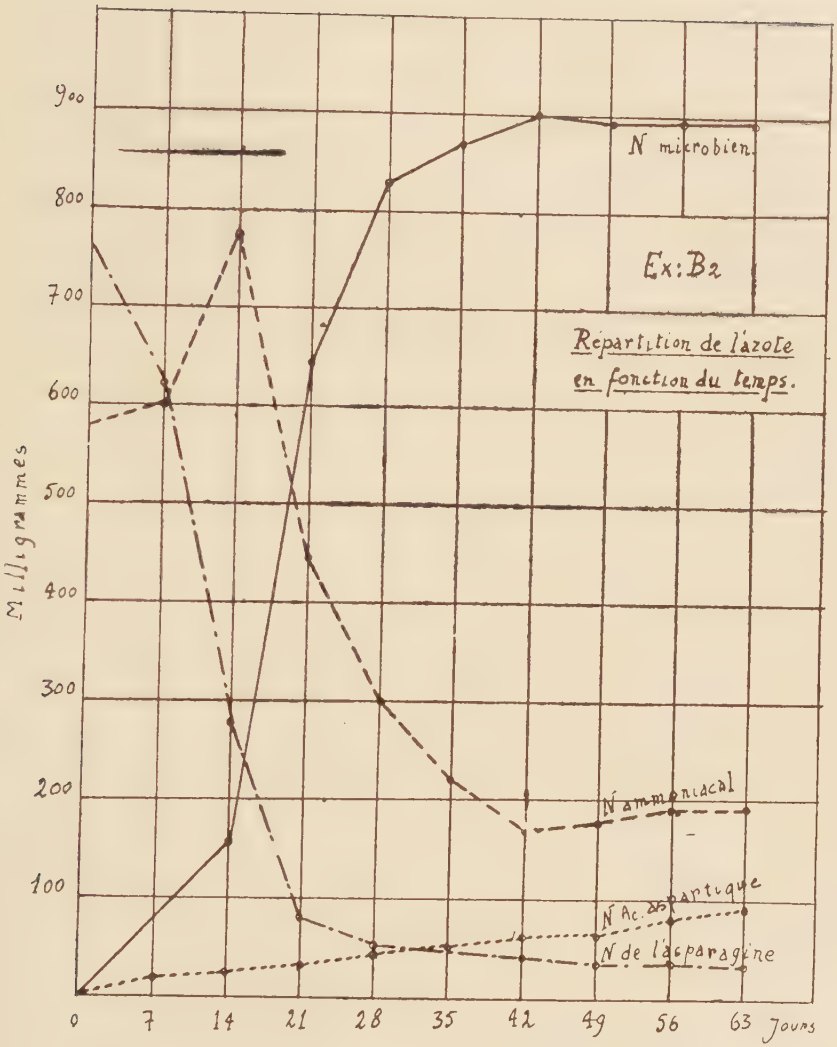


Fig. 10

que nous avons observés lors de l'étude du pH et des masses microbiennes, particulièrement.

Enfin, nous faisons remarquer que les chiffres d'azote total dosé, au 7e ou au 14e jour, diffèrent souvent de ceux du départ (0) de 100 milligrammes et plus. Cela tient, nous en avons parlé au début de ce travail, à une perte considérable d'ammoniac pendant la stérilisation à l'autoclave.

Tableau XIII. — **Répartition de l'Azote dans les cultures, en fonction du temps.** — Fig. 10.

	Temps en jours.	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
B. C. G.	Azote des microbes	0	0,025	0,245	0,595	0,933	0,954	0,972	»	»	»
	Azote de l'asparagine	0,754	0,422	0,156	0,060	0,052	0,040	0,038	»	»	»
	Az. de l'ac. asparti.	0	0,158	0,083	0,066	0,052	0,043	0,042	»	»	»
	Azote de l'ammoniac	0,600	0,641	0,758	0,530	0,215	0,208	0,194	»	»	»
	Azote total dosé	1,354	1,246	1,242	1,252	1,252	1,246	1,247	»	»	»
H.	Azote des microbes	0	»	0,065	0,427	0,752	0,831	0,899	0,940	0,919	0,991
	Azote de l'asparagine	0,754	»	0,476	0,040	0,010	0,030	0,026	0,019	0,018	0,035
	Az. de l'ac. asparti.	0	»	0,008	0,094	0,056	0,054	0,066	0,077	0,103	0,114
	Azote de l'ammoniac	0,595	»	0,692	0,698	0,437	0,335	0,243	0,179	0,186	0,121
	Azote total dosé	1,349	»	1,241	1,359	1,255	1,250	1,228	1,215	1,226	1,261
B_1	Azote des microbes	0	»	0,166	0,496	0,664	0,690	0,704	0,665	0,654	0,657
	Azote de l'asparagine	0,566	0,482	0,082	0,037	0,037	0,036	0,036	0,035	0,030	»
	Az. de l'ac. asparti.	0	0	0	0,007	0,041	0,028	0,031	0,042	0,063	»
	Azote de l'ammoniac	0,410	0,428	0,643	0,333	0,147	0,114	0,090	0,116	0,122	»
	Azote total dosé	0,976	»	0,891	0,873	0,879	0,868	0,861	0,858	0,869	»
B_2	Azote des microbes	0	»	0,157	0,643	0,826	0,876	0,907	0,891	0,870	0,894
	Azote de l'asparagine	0,754	0,626	0,280	0,082	0,050	0,056	0,036	0,036	0,035	0,034
	Az. de l'ac. asparti.	0	0,014	0,017	0,037	0,041	0,048	0,055	0,057	0,065	0,094
	Azote de l'ammoniac	0,585	0,601	0,780	0,452	0,290	0,223	0,169	0,180	0,200	0,196
	Azote total dosé	1,339	»	1,234	1,214	1,207	1,203	1,167	1,164	1,170	1,218
A.	Azote des microbes	0	»	»	0,156	0,474	0,268	0,720	0,752	1,107	1,152
	Azote de l'asparagine	0,754	»	0,661	0,514	0,302	0,142	0,084	0,054	0,104	0,081
	Az. de l'ac. asparti.	0	»	0	0,031	0,066	0,187	0,132	0,131	0,067	0,096
	Azote de l'ammoniac	0,728	«	0,706	0,685	0,519	0,801	0,469	0,472	0,126	0,067
	Azote total dosé	1,482	«	»	1,386	1,361	1,398	1,405	1,410	1,404	1,396

Nous rappellerons ici la perte d'ammoniac que subissent tous les milieux placés à l'étuve à 38° C., perte variable suivant les ballons, comme nous l'avons expliqué déjà, mais toujours plus importante dans les ballons de milieux vierges que dans ceux de milieux ensemencés.

CHAPITRE QUATRIÈME

Étude chimique quantitative des éléments minéraux

(Consommation du sulfate de magnésie
et du phosphate bipotassique)

Évolution de la concentration des ions sulfate

Le milieu de Sauton contient, au départ, 0,5 gramme de sulfate de magnésie, $SO^4Mg. 7 H^2O$.

Que devient ce sulfate au cours de l'évolution microbienne ? C'est ce que nous avons essayé de déterminer en dosant les ions SO^4 dans tous nos ballons sortant de l'étuve à 38° C.

Tout d'abord, nous avions pensé faire ce dosage après destruction de la matière organique par le chlore naissant.

Pour cela nous ajoutions à un volume connu, 50 cc. de milieu, quelques centi-cubes d'acide chlorhydrique et un peu de chlorate de potassium en poudre. Nous évaporions à sec et calcinions le résidu.

En reprenant ce dernier par un volume d'eau acidulée d'acide chlorhydrique égal au volume du départ (50 cc.), nous devions trouver dans cette solution le même taux de sulfate que dans le milieu lui-même.

Nous déterminions ce taux par le procédé Marty (18) (solution de chlorure de baryum à 2,804 grammes dans un litre d'eau distillée acidulée avec 10 cc. d'acide chlorhydrique), liqueur qui sert au dosage rapide des sulfates dans les vins.

5 cc. de cette liqueur peuvent précipiter un gramme de sulfate de potassium, ce qui correspond à 1.413 gramme de sulfate de magnésie à 7 molécules d'eau.

En établissant une table de correspondance en sulfate de magnésie, l'opération était assez rapide.

Mais l'irrégularité et souvent la faiblesse des résultats trouvés nous ont montré que, lors de l'évaporation à sec, en présence de

chlore naissant, et de la calcination, nous devions perdre une partie de notre soufre.

Nous avons essayé également l'évaporation en présence d'acide azotique, suivie de calcination; nous n'avons pas obtenu un meilleur résultat.

C'est alors que nous avons été amené à employer un procédé très simple : précipitation directe du sulfate dans le milieu de Sauton additionné d'un peu d'acide chlorhydrique, par comparaison avec une gamme de milieu de Sauton témoin, traité dans les mêmes conditions. Voici comment nous avions conçu ce dosage :

Nous placions 5 cc. du milieu à essayer dans un tube à essais.

D'autre part, nous mettions dans une série de tubes à essais, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, etc. cc. de milieu de Sauton vierge, de la même préparation que celui de l'expérience, conservé au laboratoire, pour que son taux de sulfate n'ait pas varié par concentration.

Dans chacun des tubes précédents, nous ajoutions la quantité d'eau distillée nécessaire pour parfaire 10 cc., soit 5, 5,5, 6, 6,5, etc. cc. Nous rendions homogènes les contenus de tous les tubes et ajoutions dans chacun :

V gouttes d'acide chlorhydrique pur,
et V gouttes de solution de chlorure de baryum à 10 p. 100.

Après agitation, tous les tubes étaient abandonnés au repos pendant dix minutes, puis le tube n° 1 était comparé successivement avec tous les autres, en pleine lumière et au-dessus de caractères d'imprimerie bien nets, pour juger auquel il pouvait être comparable par son opacité. Si c'était le tube contenant 3,5 cc. du témoin, cela correspondait à 0,35 de sulfate de magnésie par litre.

La méthode était très simple, et la présence de glycérine ne nous gênait pas, puisque tous nos tubes en contenaient plus ou moins. En tout cas c'est le seul procédé rapide qui nous ait donné satisfaction.

Nous avons tenu à nous assurer que la glycérine et les quelques matières organiques qui entrent dans la composition du Sauton n'empêchaient pas la précipitation du sulfate de baryte. Pour cela nous avons opéré comparativement sur un milieu de Sauton vierge, non étuvé, et une solution aqueuse de sulfate de magnésie à 0,5 gr. pour 1.000 cm3.

Quelles que soient les quantités prises au départ (2, 3, 4 ou 5 cm3) étendues à 10 cm3 avec de l'eau distillée, nous obtenions toujours des opacités absolument comparables pour les deux solutions.

Dans le tableau suivant, nous avons réuni les résultats de nos dosages de sulfate pratiqués en principe sur tous les milieux.

Tableau XIV. — **Evolution de concentration en ions $So^{\cdot}$ et consommation**

Temps en jours		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Sauton cultivé en :	B. C. G.	0,500 0	»	0,224 (55,2 %)	0,187 (62,6 %)	0,202 (59,6 %)	0,222 (55,6 %)	0,202 (59,6 %)			
	H.	0,500 0	»	0,414 (17,2 %)	0,385 (23 %)	0,310 (38 %)	0,335 (33 %)	0,216 (56,8 %)	0,259 (48,2 %)	0,253 (49,4 %)	0,252 (49,6 %)
	B_1	0,500 0	»	0,403 (19,4 %)	0,356 (28,8 %)	0,245 (51 %)	0,175 (65 %)	0,129 (74,2 %)	0,128 (74,4 %)	0,128 (74,4 %)	» »
	B_2	0,500 0	»	0,360 (28 %)	0,314 (37,2 %)	0,270 (46 %)	0,157 (68,6 %)	0,130 (74 %)	0,086 (82,9 %)	0,085 (83 %)	» »
	A.	0,500 0	»	0,417 (16,6 %)	0,314 (37,2 %)	0,309 (38,2 %)	0,354 (29,2 %)	0,215 (57 %)	0,213 (57,4 %)	0,041 (91,8 %)	0,041 (91,8 %)

Les chiffres que nous présentons ci-dessus sont calculés sur le milieu de Sauton tel qu'il était au départ. Nous sommes obligé de tenir compte de la perte en eau de chaque ballon, autrement nos résultats se trouveraient tous faussés par la concentration du liquide à l'étuve.

Nous avons placé au-dessous de chaque taux de sulfate de magnésie par litre restant dans le milieu, le pourcentage de consommation correspondant. A part deux ou trois chiffres qui ne paraissent pas cadrer avec leurs voisins, et proviennent de ballons dont l'évolution a été faussée, les séries décroissantes des taux d'ions SO^4, comme les séries croissantes des taux de consommation de ces ions sont parfaitement régulières.

Notre tableau nous permet de constater que tous les bacilles ne sont pas également consommateurs de sulfate.

Les bacilles B.C.G. et humain utiliseraient à peine 50 à 60 % du sulfate mis à leur disposition, alors que les bacilles B. et A. en utiliseraient bien davantage, 83 à 91,8 p. 100. Fig. 11.

Tout le soufre ainsi disparu des milieux n'entre pas dans la constitution de la matière des microbes; nous avons vu précédem-

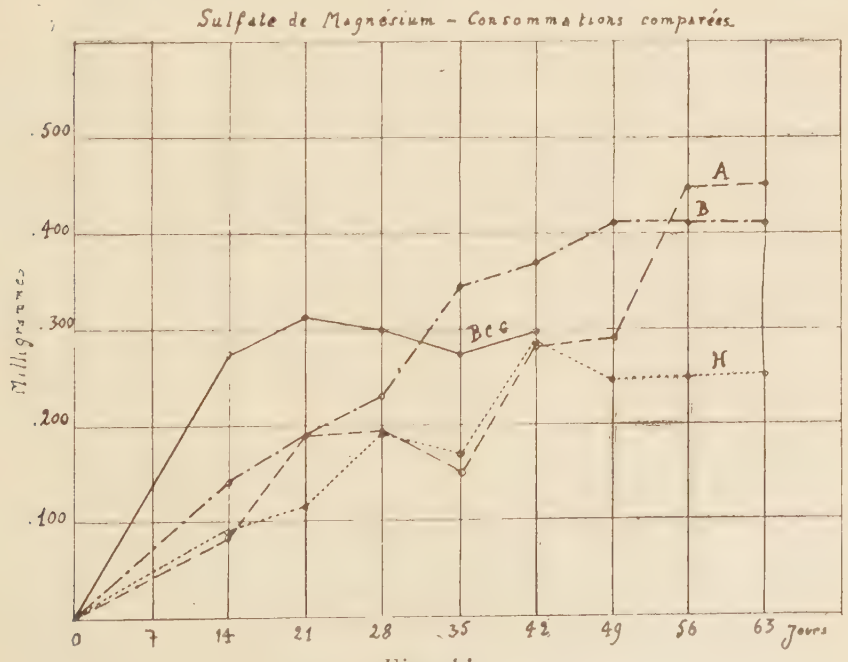


Fig. 11

ment qu'une partie était éliminée à l'état d'H^2S. Toutefois, nous constatons que les plus forts pourcentages de consommation de soufre coïncident exactement avec les plus fortes masses microbiennes recueillies. Le rapprochement des deux tableau III et XIV est significatif à ce point de vue.

Evolution de la concentration des ions PO^4.

Consommation en phosphate bipotassique

Le phosphate bipotassique, $PO^4 HK^2$, figure dans le milieu de Sauton dans la proportion de 0,5 gramme pour un litre.

Nous avons essayé d'en pratiquer le dosage directement comme on le pratique sur une urine, par la liqueur d'urane. Tous nos résultats étaient beaucoup trop forts. Ainsi, sur le Sauton vierge, nous trouvions un taux supérieur à 0,900, alors qu'il est en réalité de 0,500. Nous avons dû y renoncer.

Nous avons encore essayé de détruire la matière organique par le chlore naissant, puis de calciner et titrer l'ion PO^4 sur le résidu. Mais nous avons eu le même inconvénient que pour le titrage des ions SO^4, nous perdions une bonne partie du phosphate.

Nous nous sommes donc contenté d'agir ainsi qu'il suit :

Nous placions dans une capsule de porcelaine, 50 cm3 de milieu, auxquels nous ajoutions 3 cm3 d'acide azotique pur et nous portions au bain-Marie bouillant jusqu'à dessiccation complète. Nous calcinions alors au moufle.

Les cendres refroidies, reprises par quelques gouttes d'acide chlorhydrique pur, puis par 50 cm3 d'eau distillée, directement dans la même capsule, donnaient une solution contenant, à la même concentration que dans le milieu analysé, tout le phosphate débarrassé de la matière organique. C'est sur cette solution que nous dosions le phosphate par la liqueur d'urane.

Solutions nécessaires :

A. — *Solution d'azotate d'urane :*

Azotate d'urane	40 gr.
Acétate de soude pur	10 gr.
Eau distillée	Q. S. p. 1.000 cm3

Cette solution doit être titrée, comme nous l'indiquerons plus loin.

B. — *Solution d'acétate de soude acétique* (Joulie) :

Acétate de soude pur crist. ..	100 gr.
Acide acétique cristallisable..	50 gr.
Eau distillée	Q. S. p. 1.000 cm3

C. — *Teinture de cochenille :* Faire macérer 8 jours, 2 grammes de cochenille entière dans 150 grammes d'alcool à 25° et filtrer.

D. — *Solution titrée de phosphate* (Joulie) :

Phosphate d'ammoniaque acide $PO^4\ H_2\ (NH^4)$ pur et séché à 100° c.	3 gr. 240
Eau distillée	Q. S. p. 1.000 cm3

Additionner cette solution de thymol ou de camphre pour la conservation. 50 cm3 de cette solution correspondent à 0,10 gr. d'anhydride phosphorique P^2O^5.

Titrage de la solution d'urane. — Mettre dans une capsule de porcelaine :

50 cm3 de solution de phosphate;
5 cm3 de solution d'acétate acétique;
et 1 cm3 de teinture de cochenille.

Faire bouillir et maintenir le liquide à une température voisine de l'ébullition; verser, à l'aide d'une burette de Mohr, la solution d'urane jusqu'à ce que l'addition d'une goutte fasse virer au vert le mélange primitivement rouge.

Si on a versé 20,6 cm3 d'urane, ces 20,6 cm3 auront précipité 0,10 gr. de P^2O^5.

1 cm3 aura précipité $\frac{0,10}{0,6} = 0,00485$. C'est ce nombre qui sera inscrit sur l'étiquette.

Dosage dans le milieu de Sauton. — A notre solution débarrassée de matière organique, obtenue plus haut, nous ajoutions quelques gouttes de teinture de cochenille, de l'ammoniaque jusqu'à teinte nettement violette, pour saturer l'acide minéral existant, puis de l'acide acétique au 1/10 pour ramener la teinte au rouge; enfin 5 cm3 de la solution d'acétate acétique de Joulie.

Nous portions à l'ébullition, et tout en maintenant le liquide à une température voisine de l'ébullition, nous y versions goutte à goutte la solution d'urane jusqu'à teinte verte.

Malheureusement les choses ne se passaient pas toujours aussi simplement.

Emploi du ferrocyanure de potassium comme indicateur. — Parfois le virage de la cochenille au vert n'était pas facilement perceptible, nous avions recours à l'ancien procédé au ferrocyanure de potassium. Ce dernier était employé comme indicateur, non pas dans le liquide à doser, mais étalé en gouttes sur une surface blanche, en porcelaine par exemple, ou, à défaut, sur un papier glacé. De temps à autre on prélevait une goutte du mélange chauffé (phosphate, acétate acétique et urane) et on la transportait sur une goutte

de ferrocyanure. Dès que l'urane était en excès, le mélange des deux gouttes prenait une teinte chamois dûe à la formation de ferrocyanure d'urane. C'était le terme de la réaction.

On ne peut, en pratique, si l'on a beaucoup de liqueur d'urane à verser, faire l'essai de la touche à toutes les additions. Alors on fait un premier dosage approximatif qui permet, sur une deuxième prise d'essai, de verser d'un coup la majeure partie de la solution d'urane nécessaire, puis d'achever le dosage par petites additions suivies de la touche au ferrocyanure.

On bien on opère en présence de cochenille, et quand on arrive au moment où la cochenille va virer au vert, on achève encore par additions plus faibles et touches au ferrocyanure.

Pour chacun de nos titrages, nous avons employé de faibles quantités d'urane, de 0,8 cm3 à 2 cm3 de liqueur titrée. Mais le virage de la cochenille s'étant montré assez inconstant, nous avons adopté le processus suivant :

Au liquide à titrer, bouillant, on fait une première addition de 0,5 cc., puis des additions successives de 0,1 cc. de liqueur d'urane, suivies chacune automatiquement d'une touche au ferrocyanure, en ayant soin de noter le volume de liqueur correspondant à chaque goutte touchée. Et l'on observe la série de touches après 1 ou 2 minutes, quand la couleur s'est bien développée.

On obtient ainsi une gamme de couleurs chamois d'intensités croissantes. La couleur la plus faible correspond sensiblement au point où la cochenille vire au vert. La première goutte qui donne la coloration maxima est celle qui marque la fin du titrage; elle correspond généralement à un écart de 0,4 cc. de liqueur d'urane avec celle de coloration minima.

Mais il y a encore une petite complication : c'est la correction que doit subir le volume d'urane versé. En effet, il a fallu en verser un certain excès pour que le liquide chaud précipite le ferrocyanure, et c'est cet excès, toujours le même quand on opère dans les mêmes conditions, qui doit être retranché du volume versé au total.

Cet excès est déterminé par un titrage à blanc sur 50 cm3 d'eau distillée, avec touche après addition de chaque dixième de cm3. Il est généralement de 0,4 cm3.

Donc, à chaque dosage de phosphate pratiqué par la méthode à la touche, nous avons dû retrancher le volume ainsi déterminé (0,4 cc.) du volume d'urane versé dans le titrage proprement dit.

Evidemment, il n'y avait lieu de faire cette correction que lorsque nous opérions avec le ferrocyanure de potassium comme indicateur.

Nous avons constaté, en opérant avec beaucoup d'attention, qu'après le virage de la cochenille au vert il a fallu ajouter 0,1 cm3 de liqueur d'urane pour obtenir la précipitation du ferrocyanure d'urane; c'est précisément le chiffre de la correction que nous venons de mentionner. Mais si le virage de la cochenille peut n'être pas fidèle, la coloration du ferrocyanure d'urane est forcément visible. C'est donc une garantie de l'employer.

Le procédé de dosage ainsi conçu nous a donné, avec le milieu de Sauton vierge, des taux très approchants de la réalité, 0,490 et 0,495. Cette fois nous pouvions l'appliquer sans hésitation.

Le titrage pratiqué comme nous le décrivons ci-dessus nous donnait la quantité d'anhydride phosphorique, P^2O^5 existant dans 50 cm3 de milieu; pour connaître la quantité de phosphate bipotassique correspondante (PO^4HK^2), il nous fallait multiplier le résultat par le facteur : $\frac{174}{71} = 2{,}45$.

Nous devions encore faire subir au chiffre calculé une nouvelle correction, du fait que le milieu avait perdu à l'étuve à 38° C., une plus ou moins grande quantité d'eau.

Nous ramenions à 300 cm3 le volume du milieu examiné, réduit par évaporation à un volume qui variait de 240 à 280 cm3 en général.

De cette façon nous avions les chiffres réels de phosphate bipotassique contenu dans un litre de Sauton ramené à son état initial.

Tous nos chiffres, ainsi corrigés, figurent dans le tableau suivant :

Au-dessous des chiffres de concentrations nous faisons figurer, entre parenthèses, les chiffres correspondants de pourcentage de consommation.

Remarque I. — Ici, comme pour le sulfate de magnésie, il semble bien que la concentration en phosphate passe par un minimum à un certain moment, pour remonter ensuite, quand s'arrête la prolifération et quand s'accentue la lyse des microbes morts. Mais le phénomène semble moins marqué que pour l'ion SO^4, et nous n'en ferons pas une règle absolue.

Remarque II. — Le bacille aviaire, en particulier, paraît encore présenter un retard dans son évolution, comparativement aux autres bacilles.

Tableau XV. — **Concentrations et consommations en phosphate au cours de l'évolution**

Temps (jours)		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	3 mois
Milieux cultivés en :	B. C. G.	0,500	0,391 (21,8)	0,337 (32,6)	0,253 (49,4)	0,246 (50,8)	0,161 (67,8)	0,161 (67,8)				
	H.	0,500	0,433 (13,4)	0,340 (32)	0,249 (50,2)	0,168 (66,4)	0,208 (58,4)	0,223 (55,4)	0,213 (57,4)	0,197 (60,6)		0,203 (59,4)
	B^1	0,500	0,454 (9,2)	0,345 (31)	0,296 (30,8)	0,229 (54,2)	0,225 (55)	0,220 56)	0,208 (58,4)	0,218 (56,4)	»	
	B^2	0,500	»	0,396 (20,8	0,330 (34	0,185 (63)	0,172 (65,6)	0,200 (60)	0,197 (60,6)	0,196 (60,8)	»	
	A.	0,500	»	»	»	0,418 (16,4)	0,406 (18,8)	0,220 (56)	0,240 (52)	0,192 (61,6)	0,127 (74,6)	

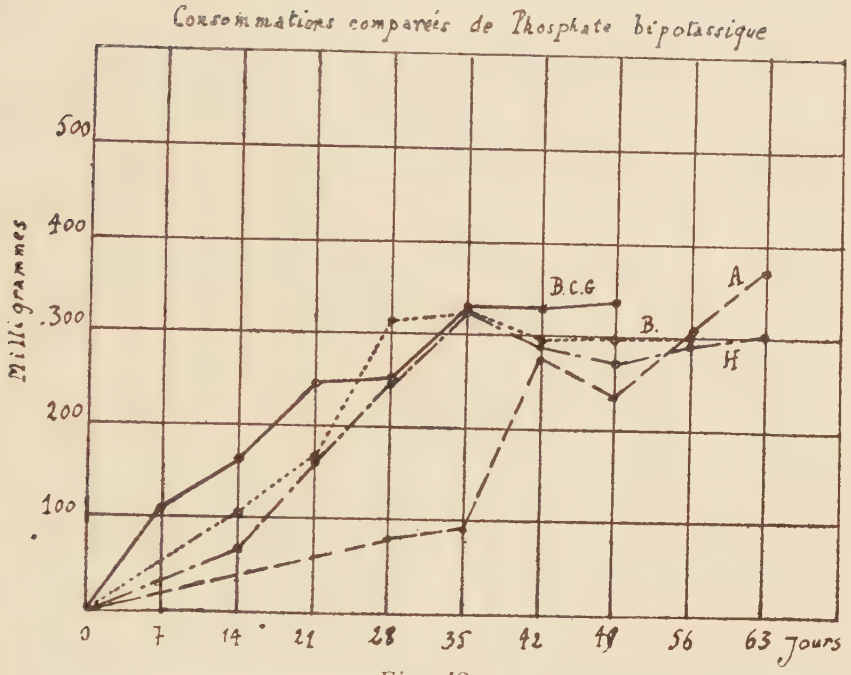

Consommations comparées de Phosphate bipotassique
Milligrammes
500
400
300
200
100
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63 Jours
B.C.G
A
B.
H

Fig. 12

TROISIÈME PARTIE

Étude des changements survenus dans les milieux au cours de l'évolution

CHAPITRE PREMIER

Essai de détermination des corps qui ont pris naissance dans les milieux

Après avoir étudié en détail la consommation des divers éléments du Sauton par les bacilles en formation, nous allons rechercher ce que deviennent ces éléments, et essayer de déterminer les modifications successives subies par chacun d'eux.

Que se forme-t-il dans le milieu de Sauton au cours de l'évolution microbienne ?

Puisque le milieu tend vers l'acidification, indubitablement il y a formation de produits acides, intermédiaires ou définitifs. Il y a aussi formation de substances protéiques, enfin, formation d'une petite quantité de substance réductrice.

Formation d'acides. — Nous avons mis en évidence la formation de produits acides en les précipitant par un métal lourd, servant généralement à la défécation des liquides organiques, le mercure. Nous avons également utilisé la précipitation par le calcium.

A vrai dire, lorsque nous avons commencé à utiliser ce mode de recherche par précipitation, nous avions l'idée d'en déduire les quantités d'asparagine demeurées intactes. Nous n'avions pas pensé que tous les produits de dégradation plus ou moins acides, formés aux dépens de l'asparagine, précipiteraient également. Le procédé n'a pas atteint le but que nous nous étions proposé, mais il nous a permis de reconnaître la présence, au moins passagère, de

produits intermédiaires destinés à être désagrégés eux-mêmes pour arriver à des corps de molécules beaucoup plus simples.

Par le mercure nous précipitions le phosphate, le sulfate, le citrate et l'asparagine, en quantités presque théoriques. Le glycérol seul ne précipitait pas; bien plus, il n'entravait pas l'insolubilisation des autres éléments; les essais que nous avons faits à ce sujet nous en ont donné la certitude.

Voici de quelle façon nous procédions :

Précipitation au mercure. — 50 cc. de milieu de Sauton, rendus alcalins par addition d'une goutte de lessive de soude à 36° Beaumé, recevaient 10 cc. d'eau distillée tenant en dissolution 0,75 gr. d'acétate mercurique. Après un repos de quelques minutes, le mélange était centrifugé, le dépôt mis en suspension deux fois dans de l'eau distillée et centrifugé à nouveau chaque fois. Le tube, bien égoutté, était ensuite porté à l'étuve à 100° et séché.

Le poids de précipité sec comprenait : asparaginate, citrate, sulfate et phosphate de mercure des 50 cc. de milieu.

Précipitation au calcium. — D'autre part, la précipitation au calcium, moins complète, ne touchait que l'acide phosphorique et l'acide citrique. Le sulfate et l'asparaginate de calcium ne précipitaient pas dans les conditions où nous nous plaçions.

Au surplus, la précipitation du citrate de calcium étant plus complète à l'ébullition, nous avions adopté le processus suivant :

a) 55 cc. de milieu de Sauton étaient additionnés de 110 cc. d'eau de chaux, à froid, et abandonnés 24 heures au repos. On filtrait sur filtre taré; l'insoluble, recueilli, était séché et pesé (p).

Résultat au litre : $p \times \frac{1.000}{55}$

b) 150 cc. du filtrat précédent étaient portés à l'ébullition, qu'on maintenait quelques minutes; on filtrait le liquide bouillant. Le précipité, recueilli sur un filtre taré, était séché et pesé (p').

Résultat au litre : $p \times \frac{1.000}{50}$.

La somme des deux résultats (a) et (b) nous donnait des chiffres très approchés des chiffres théoriques de citrate et phosphate.

Les deux modes de précipitation ainsi combinés, appliqués au milieu de Sauton vierge, nous permettaient de faire la part de chacun des éléments : asparagine, sulfate, citrate et phosphate.

Nous obtenions déjà par ailleurs les taux de sulfate et de phosphate; nous pouvions, par le calcul, savoir ce qui correspondait à l'asparagine seule.

Mais quand nous avons opéré sur des milieux ensemencés, nous n'avons pas tardé à nous apercevoir que les poids de précipité mercurique, ainsi que ceux de précipité calcique, étaient trop élevés.

Les dosages des quatre éléments ci-dessus, effectués au moyen des méthodes adoptées finalement par nous et décrites précédemment, nous ont permis d'établir, par le calcul, les poids de précipités mercurique et calcique que nous devions obtenir chaque semaine. Nous avons ainsi constaté que nous insolubilisions quelque chose de plus que les éléments recherchés, et que l'erreur par excès, ainsi commise, croissait d'abord avec le temps pour décroître ensuite et se maintenir à un niveau minimum à peu près constant.

Il faut donc admettre que le mercure et le calcium précipitaient dans les jeunes cultures, des substances qui disparaissaient ensuite, sans doute des acides, échelons transitoires dans la désagrégation de l'asparagine. Vers la fin de l'évolution, quand le poids des précipités ne variait plus, nous insolubilisions surtout les matières protéiques formées.

En ce qui concerne les acides pouvant avoir pris naissance au sein du milieu de Sauton, nous avons essayé d'en caractériser la présence.

1° Tout d'abord, nous avons appliqué à des milieux de 15 à 21 jours une technique donnée par Mestrezat (19) pour les jus de fruits, moûts et vins en particulier, technique basée sur l'insolubilité parfaite, dans l'alcool à 75°, des malate, tartrate et succinate de baryum.

Nous avons bien retrouvé une certaine quantité d'acide, qui, d'après la technique, serait de l'acide succinique, accompagné d'acide malique.

2° D'autre part, avec des produits purs de la maison Merck, acides aspartique et succinique, nous avons tenté d'obtenir, à l'état cristallisé, l'aspartate et le succinate de calcium. Pour cela nous neutralisions directement des solutions de ces deux acides par de l'eau de chaux et laissions au repos plusieurs jours; ou bien nous préparions les sels de sodium des deux acides, et faisions sur eux la double décomposition par le chlorure de calcium.

Parallèlement, dans les milieux ensemencés de 7 à 21 jours,

traités de la même manière, nous avons décalé des cristaux prismatiques se rapprochant, les uns des cristaux d'aspartate de calcium, les autres des cristaux de succinate de calcium préparés par nous, ce qui nous amène à conclure qu'au cours des premières semaines nos milieux contenaient bien des acides aspartique et succinique.

3° Dans les liquides plus anciens nous n'obtenions plus guère qu'une forme cristalline, probablement de l'acide oxalique. Il nous est arrivé d'avoir sous le microscope des petits cristaux très nets d'oxalate de calcium, en forme d'enveloppes de lettres, mais avec beaucoup de difficulté. Souvent nous avons obtenu des formes, dites formes rares en marrons ou en haltères, mais les cristaux le plus fréquemment rencontrés étaient carrés, leurs angles étaient légèrement émoussés; ils semblaient présenter des plans de clivage, non plus suivant les diagonales, mais parallèlement aux facettes.

Quoiqu'il en soit, l'acide oxalique ne peut figurer qu'en infime quantité et seulement en fin d'évolution.

Nous avons fait, sur plusieurs milieux, même anciens, des essais de précipitation de l'acide oxalique par le calcium en liquide ammoniacal et en liquide acétique. Nous avons recueilli les précipités formés et essayé d'y caractériser l'acide oxalique par les procédés classiques de l'analyse chimique; nous n'y sommes pas parvenu.

4° Une réaction sans précision, réaction colorée, nous a permis encore de reconnaître, qualitativement seulement, la présence probable des acides aspartique et succinique dans nos milieux. Elle était obtenue à l'aide d'acétate de cuivre :

A 10 cc. de Sauton nous ajoutions un centi-cube de solution saturée d'acétate cuivrique, et nous obtenions une coloration différente selon l'âge du milieu. Nous pouvions comparer toutes ces colorations avec celles d'une gamme établie en traitant de même façon des solutions d'asparagine, d'acide aspartique, d'acide succinique, d'acide maléique et d'acide citrique, qui donnent des teintes allant du bleu outremer au vert clair, en passant par le bleu franc, le bleu vert et le vert-vert.

Cette réaction fort simple confirmait en quelque sorte la présence dans nos milieux d'acides plus simples issus de l'asparagine : acides aspartique, succinique, etc...

Sans doute ces acides ne sont-ils pas les seuls qui figurent dans les milieux. D'autres constituants du Sauton peuvent aussi en engendrer, soit la glycérine, soit l'acide citrique.

Formation de substances protéiques. — Nous avons parlé, au sujet de l'azote dosé dans les milieux, d'azote protéique élaboré pour construire la matière vivante des microbes, et passant dans le liquide ambiant, lorsque ceux-ci sont morts.

Nous avons retrouvé, lors de nos précipitations par le mercure, la présence de ces mêmes substances protéiques venant, avec les acides formés dans le milieu, grossir les poids d'asparaginate, sulfate, phosphate et citrate de mercure.

Si nous avions pu douter de leur existence, les travaux de Sandor sur ce sujet nous eûssent déjà convaincu. Nous avons tenu cependant à vérifier nous-même certains caractères des protéines.

1° Le Sauton, provenant d'une culture de 6 semaines en B.C.G., filtré et additionné d'une solution saturée de sulfate d'ammonium, donnait un abondant précipité contenant protéines et polyholosides;

2° Ce précipité, redissous dans l'eau et traité par l'acide trichloracétique, donnait à nouveau un précipité de protéines débarrassées des polyholosides;

3° Le liquide séparé par filtration du précédent, donnait, par l'acide phosphotungstique, un troisième précipité assez abondant.

Enfin les réactions ordinaires des albuminoïdes étaient toutes positives avec le Sauton, soit directement, soit après concentration, plus nettes encore avec les précipités précédents, remis en solutions. Nous avons ainsi obtenu très nettement les réactions de Heller, du biuret, de Millon, xanthoprotéique.

Sandor (20) est allé plus loin, il a dosé les protéines dans un milieu de 6 semaines, et a pu trouver un taux de 0,28 gramme de protéines pour un litre. D'après nos résultats, nous l'avons déjà dit précédemment, nous avons la conviction qu'il peut en exister une plus forte proportion.

Ces protéines ne se formant qu'à la longue, dans le Sauton, on ne peut réellement les caractériser que dans les cultures anciennes.

Formation d'une substance réductrice. — Enfin il se forme dans les milieux de Sauton, au cours de l'évolution microbienne, une substance réductrice.

Sandor (21) a signalé la présence de polyholosides, précipitant en même temps que les protéines par le sulfate d'ammonium à saturation et séparables de ces dernières par l'acide trichloracétique. Sans aucun doute, il s'agit bien de la même substance.

Quoi qu'il en soit, nous avons reconnu à cette substance les propriétés suivantes, déjà énumérées par J. DEBIESSE :

1° Elle réduit directement la liqueur cupropotassique, le nitrate d'argent ammoniacal, le sous-nitrate de bismuth, etc.;

2° Elle ne précipite pas par les réactifs de défécation usuels : sels de plomb, réactif nitromercurique de Ratem, métaphosphate, acide trichloracétique, etc.;

3° Elle n'est pas volatile.

En étudiant de plus près cette substance, nous avons pu constater ce qui suit :

a) Elle dévie à droite la lumière polarisée;

b) Elle ne donne aucune coloration rouge avec l'acétate d'aniline, l'orcine et la résorcine, ce n'est donc pas un glucide en C°;

c) Elle donne, après concentration seulement, une osazone cristallisée en marrons plus ou moins chevelus, fondant aux environs de 200°; soluble, au moins en partie, dans l'acétone et l'alcool méthylique, ainsi que dans l'eau bouillante;

d) Elle est hydrolysable, car après ébullition avec les acides, elle réduit un volume de liqueur cupropotassique beaucoup plus considérable qu'auparavant;

e) Par la phénylhydrazine, le liquide hydrolysé donne un mélange de deux osazones dont l'une est nettement du glucosazone et l'autre se rapproche du galactosazone, mais ses aiguilles paraissent plus longues, plus acérées et groupées en rosaces.

f) Cette substance n'est pas, à notre avis, un produit transitoire dans l'évolution du milieu; sa présence se manifeste dès le 7e jour de culture, à l'état de traces, pour augmenter très régulièrement jusqu'à la fin. La macération du voile, après son immersion (au bout de 9 à 10 semaines), n'en augmente pas le taux. Pour ces raisons, nous ne croyons donc pas que ce soit un constituant des microbes, qui passe par lyse dans le liquide environnant. Nous sommes convaincu que c'est un déchet, le terme ultime d'une désagrégation.

Nous avons pensé, à un certain moment, que nous étions en présence de lactose. J. DEBIESSE a cru pouvoir l'affirmer dans sa thèse. Quant à nous, nous ne sommes plus du tout de cet avis.

Nous avons poussé plus avant l'étude de cette substance au point de vue quantitatif, espérant en déceler la nature exacte. Voici comment nous avons opéré :

Sachant que la substance réductrice est hydrolysable, nous en faisions le titrage avant et après hydrolyse, dans des conditions

bien déterminées, afin d'en déduire à quelle matière sucrée nous avions affaire. Nous faisions l'hydrolyse dans des conditions se rapprochant le plus possible de celles données par Denigès pour le lactose dans le lait. Voici la technique à laquelle nous nous étions arrêté :

Défécation. — Dans un ballon jaugé de 100-110 cc., 100 cc. de milieu de Sauton filtré étaient additionnés de 2,5 cc. de réactif nitromercurique de Patein. Après agitation, nous ajoutions goutte à goutte de la lessive de soude jusqu'à alcalinité, puis, goutte à goutte également, de l'acide acétique au dixième jusqu'à franche acidité. Nous complétions à 110 centi-cubes avec de l'eau distillée, et, après agitation et repos de quelques minutes, nous jetions sur un filtre. Le filtrat, recueilli dans une fiole conique, était additionné d'une pincée de zinc en poudre, agité et abandonné pendant six heures.

Hydrolyse. — Au bout de ce temps le liquide était filtré. 50 cc. étaient mesurés dans un ballon jaugé de 50-55 cc. et additionnés de 4 gr. de chlorure de sodium cristallisé, puis de 4 cc. d'acide chlorhydrique pur. Le ballon était plongé dans l'eau d'un bain-marie bouillant où nous l'abandonnions pendant deux heures. Après refroidissement, nous complétions le volume à 55 cc. avec de la lessive de soude, et nous rendions homogène par agitation.

Titrage. — Le titrage comportait trois opérations; car il était nécessaire, pour l'exactitude de nos résultats, d'utiliser une liqueur adjuvante de lactose pur à 4 grammes pour 1.000.

Les trois opérations étaient faites suivant la technique bien connue de G. Bertrand. L'oxydule de cuivre, recueilli sur un filtre, était redissous dans 25 cc. de liqueur ferrique et titré avec la solution de permanganate de potassium à 5 pour 1.000.

1° 25 cc. de milieu déféqué + 10 cc. de solution de lactose à 4 pour 1.000 + 40 cc. de liqueur cupropotassique.

Résultat : n cc. de permanganate;

2° 25 cc. de milieu déféqué, puis hydrolysé + 10 cc. de solution de lactose à 4 pour 1.000 + 40 cc. de liqueur cupropotassique.

Résultat : n' cc. de permanganate;

3° 10 cc. de solution de lactose à 4 pour 1.000 + 10 cc. d'eau + 40 cc. de liqueur cupropotassique.

Résultat : n'' cc. de permanganate.

Le titre avant hydrolyse était donné par (n-n'') cc. de permanganate, et le résultat trouvé, ramené au litre, multiplié par 11/10.

Le titre après hydrolyse était donné par (n'-n'') cc. de permanganate, et le résultat trouvé, ramené au litre, multiplié par 121/100;

Car il ne faut pas oublier que le liquide déféqué a subi une dilution de 1/10, et le liquide déféqué-hydrolysé deux dilutions successives de 1/10.

Les chiffres que nous avons obtenus étaient très variables. Tantôt nos résultats correspondaient à la présence de lactose, plus souvent à la présence de maltose, et plus souvent encore à rien de précis

Aurions-nous donc affaire à un mélange ?

L'osazone, après hydrolyse, ne semble pas toutefois comporter plus de deux sortes de cristaux.

Ce qui est bien certain, et Sandor avait raison, nous sommes en présence d'un polyholoside : diholoside ou triholoside, restant à déterminer.

Les quantités que nous trouvions dans nos milieux étaient assez variables; nous obtenions généralement des chiffres voisins de 0,500 gr. calculés en glucose. Un milieu cultivé en bacille H. nous a donné jusqu'à 0,720 gramme par litre.

Naissance d'une odeur aromatique. — Tous les milieux que nous avons eu l'occasion de manipuler dégageaient une odeur aromatique, la même pour tous les bacilles tuberculeux, et facilement reconnaissable pour celui qui en a un tant soit peu l'habitude.

Le bacille aviaire, qui se développe très lentement au début, ne manifeste cette odeur qu'à la quatrième semaine, alors que tous les autres la manifestent déjà entre 7 et 14 jours.

Il est difficile de définir cette odeur aromatique et d'en trouver une semblable parmi les parfums de fleurs que nous connaissons. Lobstein l'a comparée à la senteur du mimosa (22). Quant à nous, bien longtemps nous l'avons rapprochée de la capucine, puis de la jacinthe, et aujourd'hui nous sommes plus perplexe que jamais.

Quel peut être le corps, formé dans les milieux ensemencés, qui exhale cette odeur ? De quel constituant du Sauton prend-il naissance ? et par quel mécanisme ?

Un chercheur heureux trouvera peut-être un jour la solution de ce problème.

CHAPITRE DEUXIÈME

Essai d'interprétation chimique de l'ensemole des résultats

Jusqu'ici nous n'avons pu interpréter nos résultats que dans le cadre étroit et particulier à l'étude de chacun des constituants du milieu de Sauton.

Nous allons essayer d'étudier ces résultats dans leurs rapports réciproques et d'en tirer une interprétation d'ensemble. Pour cela nous allons mettre en balance, d'une part la somme des éléments, c'est-à-dire, la réserve de ces éléments mis à la disposition des bacilles dans le milieu de Sauton; et, d'autre part les quantités de ces éléments utilisés, soit directement pour la construction de la substance microbienne, soit comme source d'énergie pour aider à cette construction.

Eléments apportés par le Sauton. — Les éléments simples qui entrent dans la composition du Sauton sont au nombre de neuf, dont six métalloïdes et trois métaux : hydrogène, oxygène, soufre, azote, phosphore, carbone, puis potassium, magnésium et fer. S'il y a d'autres éléments, ils y sont introduits en quantités infimes, à titre d'impuretés des produits employés.

Dans le milieu préparé, il est un seul produit dont le poids soit variable, c'est l'ammoniac.

J. Debiesse avait choisi comme exemple le milieu employé au cours des expériences sur le B.C.G. Nous choisissons celui qui nous a servi à étudier le bacille H., parce que nous aurons à faire plus loin un rapprochement de nos chiffres avec ceux fournis par l'expérience de culture en appareil clos, précisément avec le bacille H.

En plus de ces éléments, mis en solution dans le milieu, les microbes ont à leur disposition l'oxygène de l'air, qui entre pour une large part dans l'évolution du voile, comme nous le verrons tout à l'heure.

Une bonne partie de ces matériaux a servi à former, en l'espace de 63 jours, 12,83 grammes de microbes secs.

Tableau XVI. — **Décomposition du milieu de Sauton en ses éléments.**

Eléments du milieu en gr. par litre	C	O	H	N	S	Mg	P	K	Fe
Glycérol 60	23,477	31,304	5,217						
Asparagine 4	1,280	1,280	0,212	0,746					
Acide citrique 2	0,685	1,219	0,095						
Ammoniac 0.722			0,127	0,595					
Sulfate de Mg. 0,500		0,128			0,064	0,048			
Phosphate de K. 0,500		0,183	0,002				0,088	0,224	
Citrate de fer amm. 0,070	0,013	0,021	0,001	0,002					0,008
	25,455	34,135	5,654	1,343	0,064	0,048	0,088	0,224	0,008

Afin d'établir la part des divers éléments dans ces 12,83 grammes, nous avons adopté, pour chacun d'eux, la moyenne des taux publiés par les différents auteurs.

En ce qui concerne l'azote, nous avons pris le taux de 7,7 p. 100, moyenne des dosages effectués par nous sur les microbes secs, recueillis après 63 jours de culture (voir tableau XII, bacille II.).

Voici donc comment se répartiraient les éléments qui composent nos 12,83 grammes de bacilles II. :

Eléments constitutifs des bacilles	C	O	H	N	S	Mg	P	Fe
Masses en grammes	6,49	3,96	1,25	0,991	0,019	0,007	0,057	0,057

Mettons en parallèle les quantités des mêmes éléments, utilisés ou transformés dans le même temps (63 jours).

Tableau XVII. — **Poids d'éléments disparus du milieu au cours de l'évolution**

Eléments du milieu % du poids engagé	C	O	H	N	S	Mg	P	K
Glycérol 67,5	15,847	21,130	3,521					
Asparagine 95	1,220	1,220	0,202	0,711				
Acide citri. 40	0,240	0,300	0,030					
Ammoniac 79,6			0,101	0,474				
Sulfate de Mg.. 49.6		0,063			0,032			
Phosphate de K 60,6		0,111	0,001				0,053	
	17,307	22,824	3,855	1,185	0,032		0,053	

Reprenons à présent les éléments un à un, et voyons ce qu'ils sont devenus.

Carbone. — Au total, 17,307 grammes de carbone, fourni tant par le glycérol que par l'acide citrique et l'asparagine ont été utilisés.

Sur cette quantité, 6,490 grammes sont entrés dans la substance microbienne: il reste donc 10,817 grammes de carbone que nous ne retrouvons pas. La plus grande partie a dû se transformer en acide carbonique, le reste est entré dans la composition des divers produits acides (CO^2H) qui demeurent dans le milieu.

En supposant que les 10,817 grammes aient été brûlés et transformés en CO^2, nous aurions là 39,662 gr. de cet acide, qui auraient nécessité 28,845 grammes d'oxygène.

Hydrogène. — Nous constatons une disparition totale de 3,855 grammes d'hydrogène. Les microbes en ont absorbé, pour leur part, 1,250 gramme. Le reste a pu être transformé en eau (H^2O), ou entrer également dans les molécules de corps acides (CO^2H) restant dans le milieu.

De toute façon, l'hydrogène a dû s'unir à l'oxygène. Pour donner 23,445 grammes d'eau, les 2,605 grammes d'hydrogène restant nécessiteraient 20,840 grammes d'oxygène.

Azote. — Le milieu a fourni 1,343 gramme d'azote. Sur cette quantité, 1,185 gr. a été utilisé ou transformé.

Nous en retrouvons, d'une part, dans les microbes, 0,991 gramme; d'autre part, dans le milieu, 0,270 gramme, tant à l'état initial qu'à l'état de produits de transformation.

En fin de compte, 80 milligrammes ont disparu sous forme d'ammoniac au cours de l'évolution.

Oxygène. — Il en a fallu :

28,845 grammes pour l'acide carbonique formé;
20,840 — pour l'eau formée;
et 3,96 — pour la masse microbienne,

au total, 53,645 grammes, sur lesquels le milieu n'a fourni que 22,824 grammes.

La différence, 30,821 grammes, n'a pu provenir que de l'air ambiant. Ce chiffre n'a rien qui puisse nous étonner, puisque, dans notre expérience de culture en appareil clos, nous avions constaté la disparition de 33,18 grammes d'oxygène de l'air pour l'obtention de 10,966 grammes de microbes secs, dans le même temps.

Soufre. — Les microbes ont fixé 0,019 gramme de soufre. Comme le milieu en a perdu 0,032 gramme, il faut admettre que la différence, soit 0,013 gramme est partie à l'état d'hydrogène sulfuré, H^2S.

Phosphore. — Enfin, pour le phosphore nous ne retrouvons pas tout à fait le poids de 0,057 gramme qui entrerait dans la composition des microbes. Notre milieu n'en ayant perdu que 0,053 gramme, nous avons dû prendre comme taux de phosphore microbien, un chiffre un peu élevé (ce taux est légèrement sujet à variations), et nous avons été amené à un écart, qui, tout bien considéré, est minime, les deux chiffres étant de même ordre de grandeur.

Nous voyons qu'en définitive nous retrouvons à peu près en totalité les éléments fournis par le milieu de Sauton pour le développement de la masse microbienne.

Essayons maintenant de suivre chacun des constituants au cours de ce développement.

Constituants du Sauton

Glycérol. — Le glycérol, comme nous l'avons vu, sert à la fois d'aliment carboné et d'aliment énergétique.

C'est un corps oxydable, il est donc probable que sous l'influence de la vie microbienne, il se transforme en aldéhyde glycérique :

$$\underset{\text{(glycérine)}}{CH^2.OH - CH.OH - CH^2.OH} + O = CH^2.OH - CH.OH - \underset{\text{(aldéhyde glycérique)}}{CHO} + H^2O$$

Comme cela se passe dans l'organisme animal, cet aldéhyde glycérique peut donner de l'aldéhyde pyruvique ou méthylglyoxal :

$$\underset{\text{(aldéhyde glycérique)}}{CH^2.OH - CHOH - CHO} = H^2O + \underset{\text{(méthylglyoxal ou aldéhyde pyruvique)}}{CH^3 - CO - CHO}$$

Ce méthylglyoxal est capable, par hydrolyse, de se dédoubler en acide formique et acétaldéhyde :

$$\underset{\text{(méthylglyoxal)}}{CH^3 - CO - CHO} + H^2O = \underset{\text{(acétaldéhyde)}}{CH^3.CHO} + \underset{\text{(acide formique)}}{HCO^2.H}$$

et l'acétaldéhyde, en fixant les éléments de l'eau, donnerait de l'alcool éthylique et de l'acide acétique.

$$CH^3 - CHO \quad \text{(alcool éthylique)} \qquad H^2/O \qquad OHC - CH^3 \quad \text{(acide acétique)}$$

A moins que les choses ne se passent suivant un processus différent, le méthylglyoxal donnant par fixation des éléments de l'eau, de l'acide acétique et de l'aldéhyde formique :

$$CH^3 - CO \quad \text{(acide acétique)} \qquad OH/H \qquad CHO \quad \text{(aldéhyde formique)}$$

l'aldéhyde formique se transformerait d'ailleurs en acide formique.

Tel serait le sort du glycérol dans nos milieux ensemencés.

Ces transformations expliqueraient parfaitement la présence, constatée d'ailleurs par Lobstein (23), dans les milieux asparaginés, glycérinés, d'aldéhyde en petite quantité, et d'acides formique et acétique.

Acide citrique. — Aliment ternaire comme le glycérol, l'acide citrique, bien qu'en petite quantité, fournit du carbone aux microbes (0,240 gramme). Il doit donc, lui aussi, passer par des formes plus simples, et, tout probablement, c'est sa fonction alcool tertiaire qui est touchée la première.

Nous avons vu, au sujet du dosage de l'acide citrique, que ce dernier, en présence d'acide sulfurique, est oxydé et transformé en acide acétone-dicarbonique, avec perte de $CO^2 + H^2O$:

$$CO.OH - CH^2 - \underset{\underset{CO.OH}{|}}{C.OH} - CH^2 - CO.OH + O$$

(acide citrique)

$$= CO.OH - CH^2 - CO - CH^2 - CO.OH + CO^2 + H^2O$$

(acide acétone-dicarbonique)

Cette oxydation, comme tant d'autres, peut être réalisée par les microbes.

Une oxydation plus avancée brisera la chaîne sur le carbone portant la fonction cétonique, et nous voici rapidement arrivé aux acides les plus simples.

Asparagine. — En ce qui concerne l'asparagine, il se fait une double hydrolyse, libérant à l'état ammoniacal, d'une part l'azote amidé, d'autre part l'azote aminé de la molécule.

L'hydrolyse du groupe amidé donnerait naissance à de l'aspartate d'ammonium :

$$COOH - CH^2 - CH.NH^2 - CONH^2 + H^2O$$
(asparagine)
$$= COOH - CH^2 - CHNH^2 - COONH^4$$
(aspartate d'ammonium)

Cette hydrolyse est très rapide, c'est elle qui enrichit le milieu en ammoniac. Au bout de 14 à 21 jours, quand elle est pratiquement achevée, la teneur du milieu en ammoniac ne peut plus augmenter; c'est à ce moment que le pH commence à revenir vers l'acidité.

Redisons encore que sur ce point, le bacille Av. fait exception, puisqu'il ne produit pas brusquement une masse d'ammoniac et n'alcalinise pas son milieu. Il hydrolyse peu à peu suivant ses besoins vitaux.

Quant au groupe aminé, son hydrolyse aboutirait aux acides malique et succinique. Cette hydrolyse se produirait plus lentement que la précédente; elle ne se ferait qu'au fur et à mesure des besoins, l'ammoniac étant consommé en même temps que libéré. Elle n'enrichirait donc pas le milieu en ammoniac.

Cela ne veut pas dire que le groupe aminé ne soit pas attaqué dès le début. Nous en avons, au contraire, des exemples dans le tableau X, où sont placés côte à côte les chiffres d'azote amidé et aminé restant dans le milieu, les 7e, 14e et 21e jours.

Par quel mécanisme le groupe aminé se transforme-t-il ? D'après la théorie de Neubauer, ce serait par oxydation, avec formation intermédiaire d'un hydrate d'imino-acide :

$$CO.OH - CH^2 - CHNH^2 - COOH + O$$
(acide aspartique)
$$= CO.OH - CH^2 - C.OH.NH^2 - CO.OH$$
(hydrate d'imino-acide)

qui, par perte d'NH^3, donnerait l'acide oxalacétique ou α-cétonique :

$$COOH - CH^2 - CO \leftarrow CO.OH + NH^3$$
(acide α-cétonique)

C'est cet acide cétonique qui produirait ensuite, par hydrogénation, d'abord l'acide malique :

$$COOH - CH^2 - CO - COOH + H^2$$
$$= COOH - CH^2 - CHOH - COOH$$
(acide malique)

et celui-ci, l'acide succinique par fixation d'H, avec élimination d'eau :

$$CO.OH — CH^2 — CH.OH — CO.OH + H^2$$
$$= CO.OH — CH^2 — CH^2 — CO.OH + H^2O$$
(acide succinique)

L'acide succinique lui-même pourrait, par simple décarboxylation, donner de l'acide propionique : $CH^3 — CH^2 — CO.OH$.

Il pourrait également, par oxydation, se transformer en acide maléique, comportant une double liaison :

$$CO.OH — CH = CH — CO.OH$$
(acide maléique)

Par rupture de cette double liaison, nous arriverions de suite à des acides plus simples.

Telles sont les transformations que peut subir l'asparagine au cours de l'évolution microbienne. Mais la disparition de l'asparagine n'est pas absolument complète, comme le pensait Lobstein. Dans nos milieux, nous retrouvons toujours en moyenne 5 p. 100 d'asparagine en fin d'évolution, ainsi que nous en avons déjà fait la remarque.

Pour terminer ce chapitre, nous étudierons ce que peuvent devenir les ions SO^4 et PO^4.

Ions SO^4. — Nous avons vu qu'une petite quantité de soufre est fixée dans la substance microbienne, et que le reste du soufre libéré a dû disparaître à l'état d'hydrogène sulfuré.

Cette transformation en H^2S a été constatée par quelques auteurs dans des circonstances analogues.

En somme, la formation d'hydrogène sulfuré pourrait s'expliquer par une réaction d'oxydoréduction, l'acide citrique, acide alcool, se chargeant de réduire les ions SO^4 du milieu.

J. Debiesse a émis l'hypothèse que cette oxydo-réduction se ferait par l'intermédiaire du glutathion, apparaissant transitoirement dans le milieu. La présence de ce glutathion est, à notre avis, trop problématique pour que nous insistions sur le rôle qui lui est attribué.

Ions PO^4. — Les ions PO^4 disparaissent progressivement du milieu, et réapparaîtraient, vraisemblablement sous forme de lécithines, dans la substance microbienne, dont ils constituent la moitié du poids des cendres.

Sans doute, l'acide phosphorique, voisinant dans le milieu avec

la glycérine, ne tarderait pas à s'unir à elle pour faire transitoirement de l'acide glycéro-phosphorique, qui est à la base de la formation des lécithines. Cet acide glycérophosphorique viendrait aussi grossir les précipités au mercure et au calcium à un moment donné.

Par ailleurs, l'ion PO^4 servirait aussi à la dégradation du glycérol. Les travaux de Schoen, sur le rôle des phosphates dans le processus de fermentation, montrent que l'éthérification phosphorée est une des réactions essentielles du processus complexe qui conduit de la molécule d'alcool à celle de l'acide carbonique.

Mais l'acide phosphorique qui aurait joué ce rôle ne serait pas perdu, on le retrouverait toujours dans le milieu.

Remarque. — De tous les constituants du milieu de Sauton, le glycérol est le seul dont la disparition continue au même rythme quand la masse microbienne est déjà presque à son complet développement. Il faut se rappeler, à ce sujet, que le glycérol joue un rôle énergétique, et que, par conséquent, il intervient encore quand les autres éléments ont à peu près terminé leur rôle. Cette persistance dans l'utilisation du glycérol est à mettre en parallèle avec la production graduelle du polyholoside.

Il se pourrait que le glycérol fût le producteur du polyholoside formé. Par quel mécanisme ? Nous ne pourrions l'expliquer, mais nous avons tenu à faire ce rapprochement.

Conclusion générale

L'étude comparée des milieux de Sauton, ensemencés avec les divers bacilles tuberculeux, B.C.G., humain, bovin et aviaire, nous a conduit à un certain nombre de déductions intéressantes.

1° Tout d'abord les masses de microbes produits croissent avec le temps pour arriver à leur maximum à un moment que nous appelons la fin de l'évolution microbienne. Ce terme a été constaté par nous :

à la fin de la 6e semaine pour les bacilles B.C.G. et B.;

à la fin de la 9e semaine pour les bacilles H. et A.

Les durées d'évolution seraient donc respectivement de 6 et 9 semaines pour ces deux groupes.

2° Le pH des milieux tend toujours vers un minimum variable suivant les bacilles :

pH = 6 pour le bacille B.C.G.;

pH = 5 pour le bacille B.;

pH = 4 pour les bacilles H. et A.

Ce minimum se produit toujours à la même époque que le maximum de masse microbienne, ce qui confirme les durées d'évolution que nous avons fixées ci-dessus pour les deux groupes de bacilles.

3° D'autre part, la mesure du pH des milieux, de semaine en semaine, nous a amené à faire cette autre constatation :

pour le B.C.G., le B. et le H., le pH commence par croître vers un maximum (7,5) qu'il atteint le 14e jour, puis décroît régulièrement jusqu'à la fin de l'évolution. Il y a donc d'abord alcalinisation, puis acidification des milieux.

pour le bacille A., le pH décroît directement sans passer par un maximum. Il n'y a pas d'alcalinisation du milieu.

La connaissance de ce fait, jointe à celles de la durée d'évolution et du minimum du pH, nous a permis d'établir un procédé de diagnose des quatre bacilles tuberculeux.

4° Les spectres d'absorption, étudiés sur les milieux, sont en concordance parfaite avec les déductions précédentes :

La bande 4860-4600 A passe par un maximum d'intensité vers le 21e jour pour les bacilles B.C.G., B. et H., mais décroît dès le début pour le bacille Av. Rappelons que l'apparition de cette bande est liée à l'alcalinité du milieu examiné.

Le seuil d'absorption, qui se déplace vers le rouge de 300 A pour le B.C.G. et le B., au 21e jour, et de 250 A. pour le H, au 28e jour, ne se déplace que de 100 A pour le bacille Av. et dès le 14e jour.

L'étude physique des milieux constitue donc pour nous une confirmation de nos résultats.

5° En ce qui concerne l'alimentation minérale, en ions sulfate et phosphate, la consommation en ces deux matières croît régulièrement jusqu'en fin d'évolution. Mais déjà, avant ce moment, la lyse des microbes morts a rendu au milieu une certaine quantité d'ions sulfate, ce qui donne l'impression d'un arrêt prématuré de la consommation du soufre.

6° Pour l'alimentation carbonée, la croissance de la consommation est très régulière jusqu'en fin d'évolution. La glycérine, détruite au fur et à mesure de son utilisation, ne peut être rendue par lyse au milieu. Le coefficient d'utilisation du carbone paraît nettement plus élevé pour le B.C.G. que pour les autres bacilles; c'est le B.C.G. qui serait le moins gaspilleur des réserves de carbone mises à sa disposition. Sans doute a-t-il besoin de moins d'énergie pour son évolution. Cette interprétation semble corroborée par l'expérience de culture en appareil clos, qui nous a permis de constater que le bacille H. dépense beaucoup plus d'oxygène et rejette beaucoup plus d'acide carbonique que le B.C.G.

Les bacilles B. et A. sont les plus gros consommateurs de glycérol.

7° Enfin, pour l'alimentation azotée, le fait le plus remarquable réside dans le rôle d'exception que joue le bacille A. En effet le bacille A. n'hydrolyse pas en masse l'asparagine, il n'hydrolyse que peu à peu, suivant ses besoins en azote ammoniacal; le taux de ce dernier ne croît donc pas comme dans les autres milieux, d'où l'absence d'alcalinisation au début, constatée lors de la mesure du pH.

Dans l'ensemble, les divers bacilles tuberculeux évoluent tous de manière analogue. La consommation qu'ils font des divers éléments mis à leur disposition ne présente que des différences de quantité, mais la marche générale de leur évolution est la même.

Seul, le bacille aviaire s'écarterait des autres par son processus

d'évolution au début (acidification directe) et sa lenteur particulière à se développer, lenteur qui ne l'empêche pas d'être, en fin d'évolution, un des plus forts consommateurs, de glycérine particulièrement.

Quant aux produits qui se forment dans les milieux au cours de l'évolution microbienne, ils paraissent bien être les mêmes pour les quatre bacilles. Nous y retrouvons les mêmes acides, formes transitoires dont les molécules deviennent de plus en plus simples avec le temps, puis, en petites quantités, des substances protéiques, un polyholoside que nous n'avons pu déterminer, et un principe aromatique, caractéristique des cultures de bacille tuberculeux.

L'étude que nous avons ainsi étendue à toute la famille des bacilles tuberculeux nous a apporté quelques résultats intéressants. Nous souhaiterions avoir le temps de la généraliser en appliquant les mêmes procédés d'investigation à tous les acido-résistants. Du moins saurions-nous si nous devons leur concéder un lien de parenté avec les bacilles tuberculeux vrais.

FIN

Planche

Index Bibliographique

(1) J. Debiesse, thèse de Doctorat ès-Sciences Physiques, Lyon, 1939.

(2) Sauton, cité dans le Manuel technique de Microbiologie du Professeur Calmette, page 440.

(3) J. Debiesse, thèse, page 29.

(4) » *C. R. Ac. des Sciences*, 18 octobre 1937.

(5) Ch. Dhéré, Recherches spectrographiques sur l'absorption des rayons ultraviolets par les albuminoïdes, les protéïdes et leurs dérivés. *Thèse Sc. nat.* Paris, 1909.

(6) F. Vlès et M. Gex, Sur les modifications des corps organiques dépendant du pH, et sur la représentation mathématique des fonctions qui relient les rapports d'absorption au pH. *Arch. Phys. biologique*, VI (1927), page 69

(7) J. Debiesse, thèse, page 81.

(8) » thèse, page 20.

(9) G. Denigès, Précis de Chimie analytique, I, page 231.

(10) » » II, pages 258 et 278.

(11) Laborde, cité dans le Traité de Microbiologie de E. Duclaux, pages 374 et 375.

(12) Nicloux, cité dans le Précis de Chimie analytique de Denigès, I, page 682.

(13) Lobstein, Thèse de Doctorat Sc. nat., Strasbourg, 1922 : Recherches biochimiques sur le bacille tuberculeux, page 43.

(14) G. Bertrand, Ann. des Fermentations, IV, 1938, page 183.

(15) Maquenne, cité dans le supplément du Dictionnaire de Chimie, Wurtz, II (1892), page 380.

(16) Ronchèse, Guide pratique pour l'analyse des urines, page 49.

(17) J. Debiesse, thèse, page 57.

(18) Marty, cité dans le Traité d'analyse des vins, J. H. Fabre, 1936, Alger.

(19) Mestrézat, *C. R. Ac. des Sciences*, 143 (1906), page 186.

(20) G. Sandor, Problème physico-chimique de la Tuberculine. *Ann. Inst. Pasteur*, LVII (1936), pages 565 à 582.

(21) G. Sandor, même référence, page 567.

(22) Lobstein, thèse, page 88.

(23) » thèse, page 62.

SECONDE THÈSE

Propositions données par la Faculté

Les Processus Généraux du Métabolisme
des Bacilles Acido-Résistants

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
L. ROYER.

Vu et permis d'imprimer :
Alger, le 29 Avril 1942.
Le Recteur de l'Académie d'Alger,
G. HARDY.